



FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DO PORTO

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

2013/2014

Cláudia Sofia Ferreira e Sousa Lima dos Santos

Doença de Machado-Joseph: do
diagnóstico à terapêutica

março, 2014

FMUP

Cláudia Sofia Ferreira e Sousa Lima dos Santos
Doença de Machado-Joseph: do
diagnóstico à terapêutica

Mestrado Integrado em Medicina

Área: Neurologia

Trabalho efetuado sob a Orientação de:
Doutora Maria Carolina Lobo Almeida Garrett

Trabalho organizado de acordo com as normas da revista:
SINAPSE

março, 2014

FMUP

Eu, Cláudia Sofia Ferreira e Sousa Lima dos Santos, abaixo assinado, nº mecanográfico 199102675, estudante do 6º ano do Ciclo de Estudos Integrado em Medicina, na Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, declaro ter atuado com absoluta integridade na elaboração deste projeto de opção.

Neste sentido, confirmo que **NÃO** incorri em plágio (ato pelo qual um indivíduo, mesmo por omissão, assume a autoria de um determinado trabalho intelectual, ou partes dele). Mais declaro que todas as frases que retirei de trabalhos anteriores pertencentes a outros autores, foram referenciadas, ou redigidas com novas palavras, tendo colocado, neste caso, a citação da fonte bibliográfica.

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 20/03/2014

Assinatura conforme cartão de identificação:

Cláudia Sofia Ferreira e Sousa Lima dos Santos.

NOME

Cláudia Sofia Ferreira e Sousa Lima dos Santos

CARTÃO DE CIDADÃO OU PASSAPORTE E-MAIL

TELEFONE OU TELEMÓVEL

10045987

mimed08261@med.up.pt

939306592

NÚMERO DE ESTUDANTE

DATA DE CONCLUSÃO

199102675

2014

DESIGNAÇÃO DA ÁREA DO PROJECTO

Neurologia

TÍTULO ~~DISSERTAÇÃO~~/MONOGRAFIA (riscar o que não interessa)

Doença de Machado-Joseph: do diagnóstico à terapêutica

ORIENTADOR

Doutora Maria Carolina Lobo Almeida Garrett

COORIENTADOR (se aplicável)

É autorizada a reprodução integral desta Dissertação/Monografia (riscar o que não interessa) para efeitos de investigação e de divulgação pedagógica, em programas e projectos coordenados pela FMUP.

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 20/03/2014

Assinatura conforme cartão de identificação: Cláudia Sofia Ferreira e Sousa Lima dos Santos

À memória da minha amiga

Mónica Castro

Doença de Machado-Joseph: do diagnóstico à terapêutica

Cláudia Santos¹

¹Faculdade de Medicina da Universidade do Porto
Alameda do Professor Doutor Hernâni Monteiro
4200-319, Porto
Portugal
Telem: 939306592
mimed08261@med.up.pt

Doença de Machado-Joseph: do diagnóstico à terapêutica

Cláudia Santos

Resumo

A doença de Machado-Joseph ou Ataxia Espinocerebelosa tipo 3 é uma ataxia hereditária dominante que, apesar de rara, é a mais frequente em todo o mundo. Existe uma elevada prevalência desta doença, inevitavelmente fatal, em algumas regiões de Portugal com forte impacto na qualidade de vida dos doentes e seus familiares.

Esta revisão teve como objetivo descrever diferentes aspetos da DMJ, tais como características clínicas, neuropatologia, genética, mecanismo patogénico e terapêuticas atualmente em desenvolvimento.

A DMJ caracteriza-se clinicamente pelo aparecimento tardio de ataxia cerebelosa progressiva, oftalmoplegia, sinais piramidais, e em alguns casos sinais extrapiramidais, principalmente distonia e neuropatia periférica. A nível patológico, os doentes apresentam perda neuronal nos núcleos espinocerebelosos, cerebelo, gânglios da base, ponte, mesencéfalo, bolbo raquidiano. Mais recentemente, foram observadas alterações noutras áreas como tálamo e lobos cerebrais. Estudos de imagem revelaram atrofia da ponte, do bolbo raquidiano e do cerebelo, com o consequente aumento do quarto ventrículo.

Esta doença é causada por uma mutação dinâmica no segmento (CAG)_n do gene *MJD1/ATXN3* (Cr14q32.1), transmitida de uma forma autossómica dominante. Indivíduos normais apresentam genes com 14-44 CAGs, enquanto que, indivíduos doentes apresentam um segmento expandido de 54-86 CAGs. O número de repetições CAG está diretamente relacionado com a gravidade da doença e inversamente relacionado com a idade de início. A expansão de CAGs origina um segmento expandido de glutamina na proteína ataxina-3, o que lhe confere propriedades tóxicas e/ou perda da sua função biológica, por alteração da

conformação normal da proteína e consequente agregação em inclusões intracelulares. A ataxina-3 participa no controlo da homeostasia celular como enzima de desubiquitinação, mas o seu papel na célula parece ser muito mais abrangente, o que tem dificultado o esclarecimento do mecanismo patogénico subjacente a esta patologia.

Vinte anos após a descoberta do gene *MJD1/ATXN3*, não existe ainda cura para a DMJ. No entanto, aos doentes pode ser oferecido aconselhamento genético e tratamento farmacológico para os diversos sintomas tais como depressão, alterações do sono, parkinsonismo, dor e distonia. Os doentes podem ainda beneficiar de apoio que lhes assegure uma melhor qualidade de vida, como por exemplo, fisioterapia, terapia da fala e terapia ocupacional.

O grande número de trabalhos publicado nos últimos anos no sentido de descobrir o mecanismo através do qual a DMJ se desenvolve e, da forma como poderá ser travada a sua progressão, leva-nos a pensar que num futuro próximo será possível tratar esta patologia bem como outras semelhantes.

Palavras-chave: Doenças de poliglutaminas, Doença de Machado-Joseph, Ataxia espinocerebelosa tipo 3, ATXN3, ataxina-3, repetições de CAG

Correspondência com o autor:

Cláudia Santos

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Alameda do Professor Doutor Hernâni Monteiro

4200-319, Porto

Portugal

climasantos@hotmail.com

Abstract

Machado-Joseph disease or Spinocerebellar Ataxia type 3 is a dominant hereditary ataxia that although rare, is the most common worldwide. There is a high prevalence of this inevitably fatal disease in some regions of Portugal with a strong impact on the quality of life of patients and their families.

This review aims to describe different aspects of MJD, such as clinical features, neuropathology, genetics, pathogenic mechanism and promising therapeutics.

MJD is clinically characterized by delayed onset of progressive cerebellar ataxia, ophthalmoplegia, pyramidal signs, and in some cases extrapyramidal signs, such as dystonia and peripheral neuropathy. Neuropathological studies reveal neuronal loss in spinocerebellar nucleus, cerebellum, basal ganglia, pons, midbrain and medulla oblongata. More recently, changes in other areas such as thalamus and the cerebral lobes were observed. Imaging studies revealed atrophy of the cerebellum, pons and medulla oblongata with a consequent increase of the fourth ventricle.

This disease is caused by a mutation in the dynamic segment (CAG)_n of the *MJD1/ATXN3* gene (Cr14q32.1), transmitted in an autosomal dominant pattern. Normal individuals have 14-44 CAGs, whereas MJD individuals have an expanded segment of 54-86 CAGs. The number of CAG repeats is directly related to the severity of the disease and inversely related to the age of onset.

The expansion of CAGs results in an expanded polyglutamine tract in ataxin-3 protein altering its normal conformation. The mutated protein gains toxic properties and/or loss its biological function, and aggregates in intracellular inclusions. Ataxin-3 regulates cellular homeostasis as a Deubiquitinating enzyme, but its role in cells seems far from being completely understood, thus MJD underlying pathogenic mechanism remains elusive.

Twenty years after the discovery of the gene *MJD1/ATXN3* there is still no cure for MJD. However, it can be offered to patients, genetic counseling, as well as, pharmacological treatment for symptoms such as depression, sleep disturbances, parkinsonism, dystonia and pain. Patients may also benefit from other support, such as physical therapy, speech therapy and occupational therapy to ensure them a better quality of life.

The large number of studies published in recent years in order to elucidate the pathogenic mechanism in MJD and also how its progression can be stopped, lead us to think that in the near future it will be possible to treat this and other related diseases.

Keywords: Polyglutamine diseases, Machado-Joseph Disease, Spinocerebellar ataxia type 3, ATXN3, ataxin-3, CAG repeats

To whom correspondence should be addressed:

Cláudia Santos

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Alameda do Professor Doutor Hernâni Monteiro

4200-319, Porto

Portugal

climasantos@hotmail.com

Introdução

O genoma humano foi durante muito tempo considerado um património estável, sujeito a recombinação meiótica e muito raramente a mutações. No entanto, há duas décadas atrás, com a identificação das mutações responsáveis pelo síndrome do X-frágil (1-4) e pela distrofia miotónica (5-8) este conceito foi alterado. Surpreendentemente, foi descoberto que aquilo que se pensava ser meras repetições benignas de trinucleotídeos, quando ultrapassam um determinado tamanho, podem estar relacionadas com doenças graves. Desde então, diversas patologias têm sido associadas a este tipo de mutações dinâmicas. Dentro das doenças causadas por expansão de repetições o grupo das doenças de poliglutaminas é o mais comum. Foram descritas até à data 9 doenças relacionadas com expansão de sequências de poliglutamina nos respectivos genes: doença de Huntington (HD), atrofia muscular espinho-bulbar (SBMA), atrofia dentatorubropalidoluysiana (DRPLA) e as outras ataxias espinocerebelosas tipo (SCAs) 1, 2, 3 (doença de Machado-Joseph), 6, 7 e 17 (9) (ver tabela I). Todas estas doenças são caracterizadas por disfunção neuronal progressiva que ocorre tipicamente na meia-idade e que resulta em neurodegeneração. Contudo, existem sintomas clínicos específicos de cada patologia. As doenças de poliglutaminas (poliQ) são todas herdadas de forma dominante com exceção da SBMA que se transmite ligada ao cromossoma X. Nesta revisão será focada especificamente a Doença de Machado-Joseph, a ataxia dominante mais comum, nos seus aspetos clínicos, neuropatologia, genética, mecanismo patogénico e estratégias terapêuticas.

Doença de Machado-Joseph

1. Definição

A doença de Machado-Joseph (DMJ) (OMIM #109150) foi descrita, pela primeira vez, em 1972 por Nakano em famílias originárias do arquipélago dos Açores, sendo mais tarde encontrada em Portugal continental e em famílias sem ancestrais portugueses,

nomeadamente americanas e japonesas. (10-15). A heterogeneidade clínica desta patologia levou a que fosse durante vários anos descrita na literatura com diferentes designações. Em 1978, Lima e Coutinho propõem o nome de doença de Machado-Joseph (14) como forma de homenagearem as duas primeiras famílias descritas “Machado” e “Joseph” e, assim unificarem as diferentes entidades clínicas descritas anteriormente como *Machado disease* (10), degenerescência nigro-espino-dentada com oftalmoplegia (11), *Joseph disease* (12) ou doença dos Açores (13). Mais tarde, foi descrita uma ataxia autossómica dominante designada ataxia espinocerebelosa tipo 3 (SCA3), tendo sido posteriormente demonstrado por estudos genéticos que esta correspondia afinal à doença de Machado-Joseph (16-17). Assim, a DMJ passou a ser referida como SCA3 em alguma literatura.

A DMJ apesar de ser uma doença rara é a ataxia dominante mais prevalente (0,3 - 2,0:100000) (18). A sua distribuição geográfica é alargada a todo o mundo com frequência relativa elevada dentro das Ataxias Espinocerebelosas (SCA) em países como Brasil (69-72%) (19-20); Portugal (58-74%) (21-22); Singapura (53%) (23); China (49%) (24-25); Holanda (44%) (26); Alemanha (42%) (27) e, Japão (28-63%) (28-29). Curiosamente, a prevalência difere consoante a região dentro de um mesmo país. Por exemplo, em Portugal continental a MJD é relativamente rara 1:100000 (30), com exceção da região do Vale do Tejo em que a prevalência é 1:1000 (31). No arquipélago dos Açores particularmente na ilha das Flores foi encontrada a maior prevalência a nível mundial 1:239 (32).

2. Aspetos clínicos

A doença de Machado-Joseph é uma doença de início tardio, manifestando-se em média por volta dos 40 anos existindo, no entanto, uma grande variabilidade da idade de início, tendo como extremos os 5 e os 73 anos (33). Os critérios de diagnóstico clínico desta doença estão bem estabelecidos e comportam um vasto leque de sintomas, dos quais o mais frequente é a ataxia cerebelosa progressiva. Os doentes

apresentam inicialmente desequilíbrio, marcha de base alargada (ataxia), a que se segue disartria, disfonia e perda de coordenação dos membros inferiores. A descoordenação dos membros superiores aparece anos mais tarde. O segundo sinal clínico mais comum é a oftalmoplegia, caracterizada inicialmente por dificuldades no olhar para cima e da convergência e, anos mais tarde, por limitações no olhar lateral (34). Em alguns doentes é igualmente observada uma retração palpebral que dá origem ao aspeto de “olhos arregalados”. Outras alterações oculares igualmente frequentes e precoces são o nistagmo, presente em 88% dos doentes (35) e a diplopia (30). Os sinais piramidais são também bastante frequentes, incluindo hiperreflexia, sinal de Babinski e espasticidade. Além destes, os doentes podem apresentar em grau variável, sinais extrapiramidais, principalmente distonia, e sinais periféricos, que podem ir desde a mera ausência de reflexos aquilianos até a atrofia muscular mais ou menos pronunciadas. Um estudo recente revelou que a fadiga é um sintoma comum a 60% dos doentes e agrava-se com a evolução da doença (36). A dor crónica manifesta-se em 50% dos doentes e embora possa ter múltiplas etiologias, muscular, neuropática ou devido à distonia, na maioria dos casos é de etiologia multifactorial. Outras manifestações clínicas menos comuns incluem retinopatia, atrofia ótica, alterações esfintéricas, hiposmia, epilepsia, caimbras, distúrbios cognitivos e comportamentais. Distúrbios do sono também podem ocorrer na DMJ e incluem o distúrbio do sono REM presente em 50% dos doentes, sonolência diurna em 60%, apneia do sono, insónia, e o síndrome das pernas inquietas presente em 55% dos doentes (37-43). A depressão é uma manifestação psiquiátrica que poderá estar subestimada na DMJ. Estas manifestações clínicas não motoras, não descritas inicialmente, podem ser explicadas pelo facto de existir degenerescência de estruturas não cerebelosas na DMJ, tal como nos gânglios da base, córtex cerebral, mesencéfalo ou ponte. Para além disso, sabe-se hoje que, o cerebelo possui outras funções para além da coordenação motora.

Existem atualmente pelo menos 30 diferentes tipos de ataxia hereditária dominante. Geralmente estas ataxias são espinocerebelosas (SCAs) e vão sendo numeradas à medida que os seus *loci* vão sendo descobertos. Este enorme número de SCAs, são um desafio diagnóstico para qualquer neurologista, mais ainda, quando cada uma delas apresenta uma variabilidade fenotípica considerável. Contudo, os doentes DMJ quando comparados com doentes com outras formas hereditárias de ataxia dominante manifestam sintomas distintivos que podem auxiliar o seu diagnóstico. Por exemplo, apresentam geralmente características mais sugestivas de doença extrapiramidal (44) o que pode ser explicado por um maior envolvimento dos gânglios basais. Em alguns casos, conforme foi referido anteriormente, apresentam bradicinesia, rigidez, distonia e tremor muito semelhantes a um doente com Parkinson (45). A espasticidade grave e neuropatia periférica pronunciada estão também mais associadas à DMJ do que a outras ataxias dominantes. Particularmente na doença de início mais tardio, a neuropatia axonal periférica pode ser proeminente e por vezes acompanhada por amiotrofia e fasciculações (46), o que revela que os danos no sistema nervoso periférico dependente da idade são precoces na DMJ. Outra característica que ocorre mais frequentemente na DMJ do que em outras SCAs é a presença de “olhos arregalados” por combinação da retração das pálpebras e diminuição dos movimentos palpebrais (30). O síndrome das pernas inquietas é também mais frequente na DMJ e normalmente manifesta-se pela ausência de atonia muscular durante os sonhos Esta pode mesmo ser a única manifestação da doença em casos menos graves (40). Os movimentos coreicos, são caraterísticos da doença de Huntington mas podem ser encontrados em ataxias como a SCA1, SCA17 ou DRPLA mas não na DMJ. A mioclonia pode ser detetada mais frequentemente na SCA2, SCA14, SCA19 ou DRPLA, a retinopatia pigmentar e cegueira estão associadas à SCA7, a discinesia ocular à SCA10 e a ataxia cerebelar “pura” com nistagmo vertical é característica da SCA6. A epilepsia é mais frequente na SCA10, SCA17 e DRPLA (47). Um dado importante no diagnóstico diferencial da DMJ é que a capacidade cognitiva se mantém

preservada nestes doentes mesmo em estadios avançados da doença, ou seja, embora possam ocorrer défices cognitivos ligeiros, a demência ou alterações cognitivas graves raramente ocorrem. Pelo contrário, na SCA17 os doentes sofrem de problemas cognitivos graves. Existem, portanto, algumas particularidades que permitem ao neurologista distinguir clinicamente algumas das ataxias. Mesmo entre doentes com DMJ é notória a grande variabilidade clínica o que, inclusivamente, originou alguma controvérsia desde as primeiras descrições que, como se referiu, a definiram como entidades clínicas diferentes. Foi, assim, necessário organizar uma classificação em subtipos com o objetivo de tornar a prática clínica mais eficaz em termos de diagnóstico (15). Na classificação proposta por Lima e Coutinho, o subtipo 1 apresenta uma idade de início menor (menos de 20 anos), com um rápido e mais grave percurso da doença que associa a ataxia cerebelosa e a oftalmoplegia com sinais piramidais graves (rigidez e espasticidade) e extrapiramidais (bradicinesia e distonia). O subtipo 2 é o mais comum, e corresponde a um estado intermédio em termos de gravidade e idade de início (20 a 50 anos), caracterizando-se pelos tradicionais sintomas de ataxia cerebelosa e oftalmoplegia com ou sem sinais piramidais, podendo ser considerada a forma inicial e transitória da doença que pode ou não evoluir para o subtipo 1 ou subtipo 3. O subtipo 3 é uma forma de início mais tardio (40 a 75 anos), com uma progressão lenta, apresentando ataxia cerebelosa e oftalmoplegia, associadas a sinais periféricos mais marcados tais como neuropatia motora e atrofia muscular. Posteriormente, foi descrito um subtipo 4 mais raro, que corresponde a doentes com a doença de Machado-Joseph associada a parkinsonismo que inclusivamente podem responder a L-dopa (45, 48). Finalmente foi descrito um subtipo 5 muito raro, em que os doentes apresentam paraplegia espástica pura (49). A sobrevida média na DMJ é de 21 anos, acabando os doentes por falecer devido ao alectuamento prolongado, pneumonia de aspiração ou asfixia (30).

3. Patologia e neuroimagem

Macroscopicamente os cérebros de doentes DMJ pesam significativamente menos que os cérebros de indivíduos sem patologia (50-51). É igualmente notória a despigmentação da *substantia nigra* e atrofia do cerebelo, ponte, bolbo raquidiano e nervos cranianos II a XII (30, 33, 51-52).

Estudos neuropatológicos convencionais documentaram perda neuronal nos núcleos espinocerebelosos, cerebelar denteado, pálido, subtalâmico, rubro, pôntico, vestibular, *substantia nigra* e, coluna de Clarke (12, 14, 30, 51-54). Segundo estes estudos a lesão da matéria branca está confinada ao lemnisco medial, trato espinocerebelar e colunas dorsais (51-52, 54).

Estudos de neuropatologia utilizando técnicas não convencionais mostraram degeneração em outros locais não descritos anteriormente, nomeadamente na substância cinzenta de múltiplas áreas envolvendo a ansa motora cerebelotalamocortical, a ansa motora gânglio basal-talamocortical, vários sistemas: visual, auditivo, somatossensorial, oculomotor e vestibular, região do tronco cerebral relacionado com a ingestão e pré-cerebelar, sistema pôntico noradrenérgico e sistema dopaminérgico e colinérgico do mesencéfalo e núcleo reticular talâmico GABAérgico (55). A degeneração da substância branca é pouco acentuada e foi apenas observada no cerebelo, medula espinal e tronco cerebral (55).

A característica mais frequentemente encontrada na RMN de DMJ é o aumento do quarto ventrículo. Estudos volumétricos utilizando RMN revelaram a atrofia da ponte, cerebelo, pedúnculo médio e superior do cerebelo, dos gânglios da base (putamen, caudado e globo pálido), alterações do diâmetro ântero-posterior e transversal do mesencéfalo e do diâmetro ântero-posterior do bolbo raquidiano (56-60). A utilização de uma nova técnica de imagem associada à RMN ajudou a clarificar o envolvimento do tálamo na DMJ (61). Estudos de espectroscopia RM mostraram ainda alterações metabólicas na substância branca sugerindo disfunção neuronal e axonal extensa (62). A utilização da glucose pelos hemisférios cerebelares, tronco cerebral e córtex

cerebral é deficitária, e pode ser detetada por PET em portadores da DMJ mesmo antes de manifestarem os sinais clínicos, o que sugere a existência de uma atividade pré-clínica da doença (63). Outras alterações detetáveis por PET com 18F-fluorodopa revelaram diminuição da ligação do transportador da Dopamina em regiões como cerebelo, tronco cerebral e sistema dopaminérgico nigro-estriado e curiosamente no córtex cerebral e no estriado (58).

Nos cérebros de doentes DMJ podem ser encontrados agregados proteicos em três diferentes locais da célula. Foram detetadas inclusões intranucleares (IN) em diversas regiões do encéfalo de doentes DMJ, principalmente na ponte, mas também no tálamo, *substância nigra*, e mais raramente no estriado (64-65). Estas inclusões contêm a proteína ataxina-3 (ATXN3) envolvida na DMJ, juntamente com outras proteínas, tais como, ubiquitina e proteínas ubiquitinadas, fatores de transcrição, proteínas contendo cadeias poliglutaminas, sub-unidades do proteassoma e proteínas de *Heat-shock* (HSP) (64-71). Ao contrário do que inicialmente se pensava, a presença das IN pode ocorrer não só em zonas afetadas pela neurodegeneração mas também em regiões do encéfalo geralmente poupadas (55, 72-73). Assim, apesar das IN serem um marcador da DMJ o seu papel preciso nesta patologia continua por esclarecer. São igualmente observadas inclusões citoplasmáticas contendo a proteína ATXN3 mutada em regiões do encéfalo onde geralmente também se observam IN (72, 74-75). Estas inclusões são negativas para a ubiquitina e consistem em grânulos de 1,5 µm de diâmetro. Agregados da proteína mutada podem, também, ser observados em fibras nervosas que degeneram na DMJ e contêm as proteínas ubiquitina e p62 e sub- unidades do proteassoma, podendo por isso ser prejudiciais para o transporte axonal e assim contribuir para a degeneração das células nervosas (76).

4. Genética da DMJ

4.1 Gene *MJD1/ATXN3*

Em 1993 foi mapeado o gene *MJD1*, atualmente designado gene *ATXN3* no cromossoma 14q24.3-q32.1 em famílias japonesas (77), confirmando-se mais tarde essa localização em famílias açorianas (78). O gene *ATXN3* foi clonado em 1994 (79), possuindo uma sequência de repetições do trinucleotídeo CAG que se encontra expandida nos doentes DMJ (79-81). O segmento de trinucleotídeos CAG é bastante polimórfico, apresentando os indivíduos normais entre 12 e 44 CAGs, e os indivíduos com DMJ entre 54 e 86 CAGs (31). Casos de alelos de tamanho intermédio foram já descritos, mas são muito raros. Os alelos intermédios provavelmente têm penetrância incompleta e não parecem associar-se a sintomas da doença ou então associam-se apenas a manifestações menos graves de ataxia, como o síndrome das pernas inquietas ou disautonomias (31, 82-85). A confirmação de que alelos entre 44 e os 54 CAG possam estar associados à presença de sintomas associados à DMJ poderá levar à alteração dos intervalos de repetições CAGs patológicos inicialmente propostos.

Apesar do gene *MJD1/ATXN3* ter sido clonado em 1994, apenas em 2001 foi determinada a estrutura da sua sequência genómica, que compreende 48240 bp, incluindo 11 exões (86). A sequência repetitiva de CAGs encontra-se no exão 10. Foram inicialmente detetados quatro transcritos, expressos ubiquamente, com diferentes tamanhos - 1.4, 1.8, 4.5, e 7.5 kb que resultam provavelmente de *splicing* alternativo dos exões 2, 10 ou 11 e da utilização de diferentes sinais de poliadenilação (79, 86-87). Com a análise das sequências dos clones de cDNA provou-se a existência de pelo menos 5 produtos do gene *ATXN3*: o primeiro clone inicialmente descrito, MJD1a (79), utiliza o exão 10 como local de terminação a 3'. Outros clones de cDNA MJD1-1 e MJD5-1 foram descritos por Goto (87) e utilizam o exão 11 como região 3' terminal. A diferença entre os clones MJD1-1 e MJD5-1 reside na utilização de diferentes sinais de poliadenilação. O clone MJD2-1 também descrito por Goto

utiliza o exão 10 como local de terminação 3' e contém, relativamente ao cDNA MJD1a, uma alteração do codão stop (TAA/TAC¹¹¹⁸), um polimorfismo frequente na população (88). O clone H2 salta o exão 2, provavelmente por *splicing* alternativo mantendo, no entanto, um quadro de leitura idêntico ao clone MJD1-1 (86).

Um estudo recente realizado a partir de amostras de sangue periférico mostrou a presença de dois novos exões no gene *ATXN3* (6a e 9a) e, ainda, 50 novos transcritos, dos quais 20 com probabilidade de tradução em diferentes isoformas proteicas (89). No futuro, é ainda necessário provar a existência destas variantes no SNC e, ainda, demonstrar o seu nível de expressão nos diferentes tecidos, bem como, determinar a sua relevância funcional e contribuição diferencial para a patologia da DMJ.

4.2 Transmissão genética e diagnóstico

A DMJ é transmitida de forma autossómica dominante, o que significa que basta que um dos progenitores (independentemente do sexo) seja portador da mutação para que haja um risco de 50% de os seus filhos ou filhas serem afetados.

Na DMJ tal como noutras doenças de repetições de nucleotídeos, ocorre uma correlação inversa entre o tamanho da repetição, a idade de início da doença, e a tendência para uma expansão maior da repetição patogénica em gerações sucessivas (34, 46, 80). Este fenómeno designado por Antecipação explica-se pelo facto de existir instabilidade genética da repetição de CAG entre gerações. Ou seja, o número de repetições pode ser diferente entre pais e filhos, existindo inclusivamente maior tendência para expandir quando o alelo mutado transmitido é paterno. O alelo normal geralmente é estável entre gerações. O alelo expandido apresenta também alguma instabilidade somática, ou seja, apresenta diferentes tamanhos de repetições CAG em diferentes tecidos, fenómeno designado por mosaicismo somático. Contudo a presença de repetições maiores não está preferencialmente associado a locais do cérebro afetados (90).

Apesar de estar bem estabelecida uma forte correlação entre o tamanho da repetição, a gravidade da doença e a idade de início, ou seja quanto maior for o tamanho da repetição mais grave serão os sintomas e mais precoce será o seu aparecimento. Hoje sabe-se que deverão existir outros fatores modificadores genéticos e/ou ambientais que podem contribuir para as diferenças clínicas encontradas entre doentes.

Curiosamente, na DMJ parece haver um efeito de dose, já que doentes apresentando dois alelos expandidos, ou seja homozigóticos para a mutação têm uma idade de início mais precoce e um fenótipo mais grave (91-96).

Após a descoberta da sequência do gene *ATXN3* passou a ser possível confirmar molecularmente o diagnóstico clínico da DMJ através da determinação do número de (CAG)_n utilizando a técnica de *polymerase chain reaction* (PCR). Atualmente, estão disponíveis testes genéticos para doentes e indivíduos pré-sintomáticos que pertencem a famílias com doentes DMJ. Em alguns países como Portugal podem ser oferecidos aos casais em risco testes pré-natal ou pré-implantatório para que possam fazer as suas escolhas relativamente à sua descendência já que, conforme foi referido anteriormente, a probabilidade de terem um filho afetado é de 50%. Indivíduos que desejarem realizar os diferentes testes genéticos deverão simultaneamente ser encaminhados para consultas de aconselhamento genético e avaliação psicossocial seguindo protocolos internacionais. Este aconselhamento torna-se particularmente importante em doenças dominantes de início tardio que permanecem sem tratamento pois o apoio médico, psicológico e psicossocial pode contribuir grandemente para a alteração da qualidade de vida dos doentes e dos seus familiares.

5. Proteína ATXN3

O gene *ATXN3* codifica a proteína ataxina-3 (ATXN3), uma proteína de apenas 42 kDa. Esta proteína apresenta um segmento variável de glutaminas na região C-terminal que corresponde ao segmento CAG do gene *ATXN3* (79), cuja expansão está associada à DMJ. A ATXN3 está conservada em vários organismos eucariotas

incluindo plantas (97-98), no entanto, apenas a proteína humana contém uma cadeia de glutaminas longa o que indica que esta não é essencial para a função da proteína.

5.1 Isoformas da proteína ATXN3

As isoformas mais representativas da proteína ATXN3 distinguem-se por terem diferentes regiões carboxílicas, e são atualmente designadas 2UIM e 3UIM. A primeira é uma variante de *splicing* que corresponde ao clone MJD1a inicialmente descrito que inclui 10 exões (79), e contém um domínio Josephin, dois motivos de interação com a ubiquitina, a cadeia de poliglutaminas e uma região C-terminal hidrofóbica. Esta variante pode conter mais 16 aminoácidos dependendo da ausência de um codão stop prematuro devido a um polimorfismo muito frequente na população e passa a designar-se 2UIM-long. A isoforma 3UIM foi descrita por Goto e corresponde a uma variante de *splicing* MJD 1-1 que contém 11 exões e apresenta mais um UIM na região carboxílica (87). A isoforma 3UIM é largamente expressa (65) e é a principal isoforma encontrada a nível do encéfalo (99). Um estudo recente revelou que as duas principais isoformas, 2UIM e 3UIM, partilham a mesma função de desubiquitinação *in vitro*. Contudo, a variante 2UIM agrega mais facilmente e é mais rapidamente degradada pelo proteassoma. Estes dados indicam que sequências de aminoácidos diferentes conferem propriedade distintas às variantes proteicas da ATXN3, o que associado ao facto da sua expressão ser também diferenciada pode explicar porque só uma população específica de neurónios é afetada na DMJ.

5.2 Padrão de expressão

A ATXN3 apresenta uma expressão ubíqua, ou seja, encontra-se distribuída tanto no SNC como em outros tecidos do organismo (65, 97, 100-104). A nível celular a ATXN3 pode ser encontrada no citoplasma e no núcleo (65, 101, 103, 105). Atualmente, existem dados que apoiam o facto da proteína normal se encontrar sobretudo no citoplasma, embora também seja possível a sua localização nuclear. A presença da

proteína mutada no núcleo é essencial para a patogénese da doença (106-107), nesse local encontra-se em inclusões nucleares e é completamente imóvel formando verdadeiros agregados (64-65, 108).

A presença da proteína no núcleo pode ser explicada pela existência de possíveis sinais de localização nuclear (NLS) na proteína ATXN3 nos resíduos 282-285 e/ou 273-286, este último confirmado por estudos funcionais (109). Uma vez no núcleo, a ATXN3 associa-se à matriz nuclear (103). Na proteína existem igualmente vários possíveis sinais de exportação nuclear (NES) que poderão opor-se à atividade dos NLS, o que explica a presença da proteína normal sobretudo no citoplasma.

5.3 Estrutura e domínios

A região N-terminal da ATXN3 tem conformação globular e compacta, sobretudo em α -hélice, em contraste com uma porção C-terminal, contendo as poliglutaminas mais flexível, destruturada e desorganizada (110-112).

A região N-terminal encontra-se bastante conservada e contém um domínio Josephin, comum a 30 proteínas de diferentes espécies. Hofmann e os seus colaboradores através de um estudo bioinformático propuseram, pela primeira vez, que a ataxina-3 está estruturalmente relacionada com uma classe de proteases específicas da ubiquitina assumindo a mesma conformação das famílias de proteases UCH (*Ubiquitin C-terminal hydrolase*) e UBP (*Ubiquitin specific protease*), o “papain fold” (113). Este mesmo estudo mostrou que a ATXN3 mantém conservado o local de atividade catalítica destas proteases e permitiu prever que o domínio Josephin contém um local catalítico de protease cisteínica ($Q^9-C^{14}-H^{119}-N^{134}$), provavelmente envolvido na proteólise da ubiquitina, ou seja na hidrólise de ligações isopeptídicas entre monómeros de ubiquitina ou entre a ubiquitina e outras proteínas (113), observação posteriormente confirmada experimentalmente (112, 114-116). Assim, a ATX3 em conjunto com as restantes proteínas contendo o motivo Josephin foram agrupadas numa nova classe de enzimas de desubiquitinação (DUBs).

Foi posteriormente demonstrado que o domínio Josephin é constituído por dois subdomínios, um catalítico e globular e outro com uma conformação essencialmente em gancho helicoidal (*helical hairpin*) (115-116). O domínio Josephin apresenta na sua superfície dois locais de ligação para a ubiquitina, o primeiro entre os dois subdomínios e o segundo contíguo mas na face oposta (117). A importância estrutural do domínio Josephin originou estudos da sua estabilidade conformacional e tendência para agregar. Um resultado surpreendente provou que este domínio apresenta um comportamento semelhante ao da ATXN3, no que diz respeito à estabilidade e às propriedades de agregação, ou seja, uma transição conformacional de α para β associada à agregação e dependente da temperatura e concentração (111).

A região C-terminal da ATXN3 é parcialmente desorganizada, sobretudo na região que contém o segmento poliglutaminas, mas com elevado conteúdo de estrutura secundária nas regiões onde estão localizados os motivos de interação com a ubiquitina (UIMs), que se sabe serem em α -hélice (110, 112). Os domínios UIMs foram inicialmente encontrados na subunidade S5a (Rpn10) do complexo 19S do proteassoma, e estão conservados nos vários ortólogos da ATXN3, o que sugeriu a sua relevância na função normal da proteína. Na ataxina-3, existem dois UIMs localizados antes do segmento de glutaminas, e um outro localizado após o segmento de glutaminas apenas presente na variante proteica 3UIM (118-119).

5.4 Função e interações

Apesar do número crescente de trabalhos publicados nos últimos anos tendo como objetivo o esclarecimento das propriedades biológicas da ATXN3, a sua exata função permanece por determinar. As hipóteses propostas para a função da ATXN3 são as seguintes:

(i) vários estudos indicam que a ATXN3 pertence a uma classe de proteases da ubiquitina também designadas de enzimas de desubiquitinação (DUBs). As enzimas DUB estão implicadas na remoção de monoubiquitina ou poliubiquitinas de proteínas

alvo e também na separação das ligações entre monómeros de ubiquitina. O processo de ubiquitinação é um mecanismo através do qual a célula regula várias atividades celulares, nomeadamente a degradação de proteínas *misfolded* e proteínas de semi-vida curta pelo proteassoma, a reparação do DNA, a remodelação da cromatina e o ciclo celular e vias de sinalização. A ATXN3 liga-se a cadeias com mais de 4 ubiquitinas através dos seus dois primeiros UIMs que atuam de uma forma sinérgica (114, 119-122). Foi demonstrado que nos neurónios, a ATXN3 liga-se a proteínas poliubiquitinadas, mais uma vez, de uma forma dependente dos UIMs (123). Quando os seus UIM estão mutados a capacidade de ligação à ubiquitina é perdida. Foi demonstrado *in vitro* que a ATXN3 pode clivar cadeias de poliubiquitina de substratos ubiquitinados, bem como, separar monómeros de ubiquitina de cadeias de poliubiquitina. Esta atividade de desubiquitinação é perdida após mutação da cisteína 14 do local catalítico (112, 114-116). Foi ainda possível verificar o aumento de proteínas poliubiquitinadas em ratinhos KO para a ATXN3 e em células expressando a proteína inativa (123-124). Vários resultados sugerem que a ATXN3 funciona como protease na edição das cadeias de ubiquitina, ou seja encurta o tamanho dessas cadeias em vez de as remover totalmente do substrato alvo (114, 125-127). Desta forma, é proposto que como DUB a ATXN3 recruta as proteínas poliubiquitinadas através dos seus UIMs que juntamente com o local 1 de ligação à ubiquitina situado no domínio Josephin posicionam corretamente as cadeias de ubiquitinas que serão assim expostas ao local catalítico do domínio Josephin responsável pela sua proteólise. O facto de não terem sido ainda encontrados o(s) substrato(s) alvo da desubiquitinação da ATXN3 limita de certa forma o seu enquadramento preciso neste mecanismo celular.

(ii) Diversas evidências associam a ATXN3 com a via da ubiquitina-proteassoma, por exemplo, a inibição do proteassoma origina a coprecipitação de proteínas poliubiquitinadas juntamente com a ATXN3 (119, 121).

Adicionalmente, as diferentes isoformas da proteína podem ligar-se ao proteassoma e a duas proteínas- hHR23 e VCP- implicadas no transporte de substratos para o proteassoma para posterior degradação (120). Os homólogos humanos -hHR23A e hHR23B - da proteína de levedura RAD23 interatuam com a ATXN3 através do domínio *ubiquitin-like* (UBL) (128). As proteínas hHR23A e hHR23B ligam-se ao 2º local de ligação à ubiquitina presente no domínio Josephin da ATXN3 (115, 128). As hHR23 interatuam ainda com a subunidade S5a do proteassoma (Rpn10) (129); ligam-se à ubiquitina (130-131), a cadeias de poliubiquitina (132) e a proteínas poliubiquitinadas (133). A ATXN3 através da sua região C-terminal liga-se à VCP (*valosin-containing protein*)/p97, uma ATPase AAA envolvida no controlo da divisão celular, na fusão membranar, transporte vesicular e na via de degradação ubiquitina-proteassoma (120, 134-136). Foi assim proposto que a ATXN3 participaria num complexo que transporta proteínas para o proteassoma com vista à sua degradação. Adicionalmente, foi proposta que esta função possa estar relacionada em particular com a degradação de proteínas associada com o retículo endoplasmático (ERAD). O ERAD é o mecanismo através do qual ocorre a ubiquitinação de proteínas com defeitos de conformação ou elementos não complexados das vias de secreção que são exportadas do retículo endoplasmático (RE) para o citosol para serem degradadas pelo proteassoma. Sabe-se que o complexo VCP/ATXN3 interatua com componentes da membrana do RE controlando a exportação e a degradação de proteínas *misfolded* do RE (137-138). Foi assim proposto que o complexo VCP/ATXN3 pode servir para transferir substratos poliubiquitinados, após terem sido editados pela ATXN3, diretamente para o proteossoma ou para outras proteínas transportadoras tal como a hHRAD23A/B (120, 128).

Outro aspeto interessante que tem vindo a ser estudado é o possível envolvimento da ATXN3 na regulação da formação de agressomas de uma forma dependente da sua atividade DUB (125, 139). Estes agressomas correspondem a proteínas *misfolded* agregadas junto ao centro organizador dos microtúbulos (MTOC). Os agressomas são

de extrema importância sempre que o proteossoma não consegue lidar com as proteínas *misfolded* já que permitem que estas possam ser degradadas pelos lisossomas contribuindo assim para a manutenção da homeostasia celular. A interação da ATXN3 com outros componentes implicados na organização do agressoma tais como, dineína, HDAC6 (*Histone deacetylase 6 inhibition*), PLIC1 (*protein linking IAP to the cytoskeleton*) e microtúbulos apoiam a importância da ATXN3 neste processo celular (125, 139-140). Estes dados apontam para o envolvimento da ATXN3 em mecanismos de controlo de qualidade celular reconhecendo-a como uma proteica neuroprotetora, seja como transportadora de substratos para o proteossoma ou como DUB.

(iii) A ATXN3 é capaz de regular a transcrição. A regulação da transcrição pode ser feita por diversos mecanismos já que a ATXN3 interatua com inúmeros reguladores da transcrição como por exemplo: TATA *box binding protein* (TBP)-*associated factor 4* (TAF4); com os ativadores da transcrição CBP, P300 e PCAF; *Nuclear receptor co-repressor* (NCoRI); *Histone deacetylase* (HDAC) 3 e 6; *Forkhead box O* (FOXO) e hHRAD23A/B. Assim, pode inibir a transcrição por ligação a ativadores da transcrição CBP, P300 e PCAF impedindo a acetilação do DNA (141-142). Por outro lado, esta proteína pode inibir diretamente a transcrição *in vivo*, impedindo a acetilação de histonas, uma vez que ao ligar-se às histonas H3 e H4 pode bloquear o acesso dos co-ativadores aos locais de acetilação (142). A ATXN3 interatua igualmente com dois repressores da transcrição HDAC3 (*histone deacetylase 3*) e NCoR (*nuclear receptor corepressor*) promovendo a desacetilação de histonas e a consequente inibição da transcrição (143).

Estudos recentes revelaram que a ATXN3 para além de estar envolvida na homeostasia celular, e na regulação da transcrição pode ainda participar em outros mecanismos celulares tais como miogénese ou organização do citoesqueleto, (140, 144). Contudo, é possível que a proteína esteja envolvida nestes diversos mecanismos apenas de uma forma indireta, já que participando em mecanismos de controlo de qualidade da célula como DUB ou como proteína transportadora de

proteínas para o proteassoma, ela inevitavelmente vai interferir com a semi-vida de diferentes proteínas que fazem parte de diversos mecanismos celulares.

6. Mecanismo patogénico

Foram descritas 9 doenças relacionadas com expansão da sequência de poliglutamina nos respetivos genes (9) (ver tabela I). Não foi, até à data, esclarecido o mecanismo patogénico subjacente a esta classe de doenças, mas diversos estudos em modelos celulares e animais revelaram que são causadas pela presença da expansão do segmento de glutaminas (poliQ) (9). Existem aspetos partilhados por todas as doenças de glutaminas que sugerem a existência de um mecanismo patogénico comum: (I) As proteínas envolvidas nas doenças de glutaminas não possuem qualquer característica comum entre elas, para além do segmento de poliglutamina; (II) quanto maior o tamanho da repetição mais graves são os sintomas da doença; (III) existe uma correlação inversa entre o tamanho da repetição e a idade de início da doença; (IV) apresentam inclusões intracelulares, predominantemente intranucleares (IN) que correspondem a agregados insolúveis contendo as proteínas mutadas ubiquitinadas; (V) as poliglutaminas mesmo fora do seu contexto proteico particular induzem neurodegeneração em modelos celulares e animais. Apesar das semelhanças acima mencionadas, algo que continua a intrigar os investigadores interessados neste grupo de patologias, é o facto de o leque de sintomas que as caracteriza ser distinto, bem como, o padrão de degeneração neuronal.

Na DMJ pensa-se que o segmento PoliQ é o fator precipitante da doença mas outros fatores podem contribuir para o seu desenvolvimento e especificidade, tais como: contexto génico onde se localiza a expansão, expressão temporal e espacial da proteína ATXN3, perda da sua função biológica e alteração das suas interações proteicas (145).

Seguidamente, irão ser considerados alguns dos mecanismos patogénicos proposto para a DMJ, os quais, não sendo mutuamente exclusivos, podendo ocorrer em simultâneo ou funcionarem como uma sequência de fenómenos ao longo da vida.

6.1 *Misfolding* e Inclusões Nucleares

A ATXN3 contendo um segmento expandido de poliglutamina apresenta uma conformação anormal, o que lhe confere propriedades tóxicas e a capacidade de precipitar no interior da célula (146). As inclusões intracelulares foram detetadas nas diferentes doenças de glutaminas e aparentemente correlacionam-se com o tamanho de CAGs e a gravidade da doença (64, 66, 147-148). As proteínas mutadas são ubiquitinadas (64, 66) e, quando presentes no núcleo, recrutam subunidades do proteassoma formando agregados nucleares (67-68, 70). Este facto indicia o envolvimento do sistema ubiquitina-proteassoma (UP) no processo patogénico, provavelmente na tentativa de degradar as proteínas *misfolded*.

Em linhas celulares e organismos modelo, a toxicidade das cadeias poliQ pode ser revertida pela sobreexpressão de *chaperones* (68, 70, 149-153), sugerindo, uma vez mais, que a célula ativa mecanismos de *refolding*, eliminação e/ou desagregação das proteínas que contenham expansão de poliglutaminas. Contudo verificou-se que a distribuição das IN em tecidos de doentes com DMJ nem sempre corresponde à distribuição da patologia (154-159).

Assim, se inicialmente parecia óbvio que os agregados eram tóxicos, atualmente coloca-se a hipótese de estes serem uma forma de diminuir os níveis da forma difusa das proteínas mutadas. Na doença de Huntington, Arrasate e colaboradores mostraram que a formação de corpos de inclusão (citoplasmáticos ou nucleares) provocava a diminuição da forma difusa da huntingtina e prolongava a sobrevivência dos neurónios (160). Bevilacqua e Loll mostraram, *in vitro*, que a ATXN3 com expansão de glutaminas formava rapidamente fibrilas em forma de folha β tipo amiloide (161-163). Nesse processo são formados vários elementos intermédios como pequenos

agregados, monómeros ou oligómeros que, atualmente se julga ser as verdadeiras entidades tóxicas e não agregados macromoleculares como inicialmente se pensava (164). Posteriormente, verificou-se que quer a variante normal da ATXN3 quer o domínio Josephin têm tendência para agregar em determinadas condições desestabilizadoras (111, 165-168). Isto sugere que o ambiente proteico em que o segmento de glutaminas se insere, e não apenas o segmento de glutaminas, possa ter interferência no processo de agregação. O domínio Josephin apresenta tendência intrínseca para auto-associação através dos seus locais de ligação à ubiquitina e pode constituir um primeiro passo para a alteração da conformação da proteína e modelar a agregação quer da proteína mutada quer da normal. De facto, julga-se que os agregados formados pela proteína mutada são insolúveis, mais estáveis e mais rapidamente formados, enquanto que, os agregados formados pela proteína normal são solúveis, instáveis e facilmente degradados pelos sistemas de controlo celular.

Apesar de, os dados atuais demonstrarem que as inclusões nucleares não são por si só as causadoras de citotoxicidade, a verdade é que a redistribuição do proteassoma e de *chaperones* para os agregados pode ter como consequência a ausência destes elementos nos locais da célula onde são normalmente necessários, um aspeto que poderá ser fundamental no mecanismo patogénico. Um outro factor eventualmente relevante para a patogénese é a presença nos agregados da proteína normal e de outras proteínas que contêm um segmento de glutaminas como, por exemplo, fatores de transcrição que, desta forma, se tornariam limitantes no interior da célula (78, 119, 141, 169-172). Recentemente, foi demonstrado que a presença de agregados nos axónios pode bloquear o transporte axonal, indicando que o papel das inclusões na patogénese não foi ainda completamente esclarecido (173).

O estudo do processo de agregação e das entidades tóxicas formadas na DMJ, bem como, em outras doenças de poliglutaminas é de extrema importância, pois permitirá o desenvolvimento de estratégias terapêuticas dirigidas a este mecanismo.

6.2 Hipótese dos fragmentos tóxicos

Em trabalhos utilizando linhas celulares e modelo em ratinho da DMJ, foi descrita uma maior toxicidade resultante da expressão do segmento truncado do gene *ATXN3* contendo as poliglutaminas, relativamente ao gene completo (64, 174-175). Alguns autores propuseram que a *ATXN3* sofre proteólise por caspases ou proteases calpaina dependentes do cálcio, dando assim origem a um fragmento tóxico contendo as poliglutaminas com uma maior tendência para agregar (176-179). Um modelo de ratinho demonstrou a existência de um local de proteólise na *ATXN3*, o qual origina um fragmento tóxico de 37 kDa, detetado em linhas celulares, em animais e doentes DMJ (108, 178, 180-181). Em *Drosophila* a mutação dos locais de clivagem por caspases reduziu a formação de fragmentos C-terminal e reduziu a toxicidade (178). Num modelo de ratinho transgénico DMJ foi provada a clivagem da *ATXN3* pela calpaina e, quando o inibidor endógeno desta proteína – a calpastatina – é retirado, houve um aumento do número de agregados nucleares, da neurodegeneração e o agravamento do fenótipo (182).

É assim possível que a proteólise da *ATXN3* seja um passo importante para a agregação e a toxicidade. No entanto, a importância deste mecanismo não é consensual, uma vez que estes fragmentos não são detetados em muitos dos modelos experimentais da doença e, noutros, foi mesmo demonstrado o contrário, ou seja, a sequência de glutaminas expandida está menos sujeita a clivagem e por isso a patogénese seria explicada pela acumulação da proteína expandida completa (183).

6.3 Perda de função da proteína *ATXN3*

Na DMJ o segmento de poliQ para além de contribuir para a formação de agregados proteicos pode interferir com a função normal da proteína, com as suas interações e com a sua localização. Animais KO para a *ATXN3* em ratinho ou no nemátode *C. elegans* não apresentaram fenótipos detetáveis pelos métodos utilizados, o que indica que a perda de função não é deletéria nem é crucial para o desenvolvimento da

doença (98, 124, 184). Uma outra hipótese proposta admite que o segmento PoliQ confere um ganho de função tóxico à proteína. Por exemplo, se de facto a ATXN3 participar em mecanismos de remodelação e degradação de proteínas *misfolded*, uma perturbação nesse mecanismo poderá originar acumulação de produtos celulares tóxicos. No entanto, sabe-se que a proteína mutada com expansão de poliQ mantém a função de DUB, tal como, a proteína normal (114, 123). A proteína mutada mantém ainda a sua capacidade de se ligar através dos seus domínios UIM, com substratos poliubiquitinados (123).

Uma forma do segmento de poliglutaminas expandido causar distúrbios na regulação da homeostasia celular poderá ser através da alteração da força de interação com complexos envolvidos nesse mesmo processo, p.e. proteassoma, estabelecendo com eles interações mais estáveis e promovendo assim a agregação proteica (120).

Da mesma forma, a interação com os seus parceiros moleculares pode ser alterada pela existência do segmento poliQ. Por exemplo, a ligação com as proteínas hHR23A e hHR23B mantém-se mesmo na proteína mutada, no entanto, a hHR23 colocaliza com a ATXN3 mutada nos agregados (128). Não deixa de ser interessante que a ATXN3 se ligue à VCP/p97 de uma forma dependente do tamanho do segmento PoliQ, ou seja, a proteína mutada tem maior afinidade para a VCP do que a proteína normal. Sabe-se que o complexo VCP/ATXN3 interatua com componentes da membrana do RE controlando a exportação e a degradação de proteínas *misfolded* do RE (137-138).

Assim, é possível que esta alteração no mecanismo ERAD induza stresse no RE e que isso de alguma forma contribua para o mecanismo neurodegenerativo (137-138). A confirmação de que a presença da mutação na proteína ATXN3 lhe confere propriedades tóxicas por um ganho de função depende do completo esclarecimento, em trabalhos futuros, da sua função biológica e do seu papel nos diferentes mecanismos celulares.

6.4 Envolvimento na maquinaria de transcrição

A ATXN3 tem capacidade de se ligar ao DNA e, por outro lado, interatua com vários reguladores da transcrição. É por isso possível que a desregulação da transcrição contribua para a patogénese da DMJ. As inclusões insolúveis, principalmente nucleares, resultantes da agregação das proteínas mutadas recrutam entre outras proteínas, ativadores e repressores da transcrição, o que indica que o envolvimento da maquinaria de transcrição pode ocorrer de forma generalizada na patologia das doenças de poliglutaminas. Foi detetado o sequestro de ativadores/co ativadores transcripcionais tais como TBP, CREB, *CREB-binding protein* (CBP) e *TATA box-binding protein-associated factor II 130 kDa* (TAFII130) para as inclusões formadas pelas proteínas contendo o segmento de poliglutamina expandido (141, 170-172, 185-186). O sequestro de ativadores transcripcionais para as inclusões formadas pelas proteínas mutadas, pode ser de grande relevância quando estes se encontram em quantidades limitantes na célula como acontece, por exemplo, com a CBP (171).

A ATXN3 inibe a acetilação das histonas. Contudo, quando está mutada pela expansão de poliglutamina este mecanismo de repressão da transcrição fica alterado, aumenta a acetilação da histona H3, aumentando também a transcrição. Este efeito foi observado quer em células quer em material humano (143).

Em vários modelos celulares e animais DMJ foram reportadas alterações da expressão de vários genes relacionados com a maquinaria da transcrição reforçando a ideia da desregulação desta via nesta doença (98, 187).

Contudo, a hipótese da desregulação da transcrição como mecanismo causador da DMJ necessita de mais investigação.

7. Estratégias terapêuticas

A doença de Machado-Joseph, tal como todas as outras doenças de poliglutaminas, permanece sem cura. Contudo, o tratamento farmacológico e não farmacológico pode ser utilizado nestes doentes de forma a minimizar a sintomatologia e a melhorar a sua

qualidade de vida (18, 188). Conforme está padronizado em *guidelines* internacionais, aos doentes DMJ e familiares em risco deve ser oferecido aconselhamento genético. Estes doentes devem ser informados da forma como se transmite a doença, do risco para os seus filhos e outros membros da família, bem como, da atual impossibilidade de tratamento curativo. Aos familiares em risco pode ser oferecida a possibilidade de realizarem testes preditivos se assim o desejarem. Os casais que pretendem ter filhos têm a possibilidade de realizar o diagnóstico pré-natal ou em alternativa o teste pré-implantatório com seleção de embriões.

Atualmente, estão disponíveis tratamentos para os diferentes sintomas da doença. Por exemplo, na depressão podem ser utilizados antidepressivos ou em alternativa psicoterapia comportamental. As alterações do sono devem ser estudadas por polissonografia e tratadas em consonância. Por exemplo, no síndrome das pernas inquietas podem ser utilizados agonista da dopamina e/ou levodopa. A dor deve ser tratada consoante a sua etiologia, músculo-esquelética, neuropática, devido à distonia ou mista. O Parkinsonismo, a distonia e espasticidade podem ser tratados com Levodopa. Como alternativa podem ser utilizados anticolinérgicos, benzodiazepinas, baclofeno ou carbamazepina. As cãibras podem ser tratadas com magnésio, mexiletina ou carbamazepina. A fadiga pode melhorar com tratamento farmacológico com metilfenidato, modafinil e amantidina, ou não farmacológico, exercício físico, educação e modificação comportamental. Os doentes podem também beneficiar de fisioterapia e terapia da fala para avaliar e melhorar a sua disartria e disfagia. A maioria dos doentes vão precisar de alterações em casa para assegurar a sua segurança. A médio prazo será necessária a utilização de auxiliares da marcha como canadianas ou andarilhos e mais tarde cadeira de rodas.

Como é evidente, o tratamento sintomático não consegue aliviar totalmente o sofrimento destes doentes, e por isso torna-se urgente conseguir-se um tratamento curativo para esta doença. Há vários anos que os cientistas se empenham na obtenção e estudo de modelos celulares e animais que melhor imitem as

características fenotípicas da DMJ com vista a encontrarem possíveis agentes terapêuticos preventivos. Várias estratégias estão atualmente sendo utilizadas em diferentes estudos com modelos da doença.

Suportando a ideia de que o silenciamento do gene mutado pode ser uma terapêutica efetiva nesta doença, um estudo realizado por Boy e colaboradores demonstrou que o fenótipo de um ratinho transgênico condicional expressando o gene ATXN3 humano mutado, foi revertido após se “desligar” a expressão da proteína mutada (189).

A técnica de silenciamento pós-transcricional de genes por RNA *interference* (RNAi) permite silenciar de uma forma eficiente vários genes causadores de doenças genéticas, através da degradação do mRNA e consequente diminuição da síntese das respectivas proteínas mutadas (190). Foi já testada a técnica de RNAi em transcritos do gene ATXN3 em ratos modelo conseguindo-se suprimir a ATXN3, diminuir o número de inclusões e a degeneração (191-193). Curiosamente, o silenciamento em simultâneo da proteína mutada e normal foi bem tolerada, o que indica que a estratégia de suprimir a expressão do gene ATXN3 mesmo que de forma não específica, pode ser considerada como uma estratégia terapêutica eficaz. Contudo, esta hipótese terá que ser melhor estudada, antes de se passar para ensaios clínicos humanos. Adicionalmente, a técnica RNAi foi bem sucedida num modelo de ratinhos transgênicos DMJ contendo um fragmento C-terminal ATXN3 já que conseguiu melhorar o fenótipo motor e as anomalias patológicas mesmo quando realizada em estadios avançados da doença (194). Contudo, um outro modelo animal em ratinho DMJ que se aproxima mais do modelo da doença, a técnica de RNAi conseguiu silenciar o gene no cerebelo sem que, no entanto, consiga anular o fenótipo motor (195).

Outra estratégia que pode ser utilizada para inibir a expressão da ATXN3 mutada utiliza um diferente tipo de moléculas, os oligomeros *antisense* complementares ao mRNA, que atuam com base nas diferenças de tamanho da sequência CAG. Estas

moléculas foram já testadas em fibroblastos mostrando uma redução dos níveis da ATXN3 *in vitro* (196-197).

Foi igualmente proposto, um novo método de modificação de proteínas que consiste na remoção da repetição de poliglutaminas expandida da ATXN3 através de uma técnica de *exon skipping* sem alterar a função normal da proteína (198). A vantagem desta técnica é que mantém os níveis de mRNA e da proteína na célula, já que apenas uma porção da proteína é retirada, mas não foi ainda avaliada a possibilidade de modificar o fenótipo de animais DMJ (198).

Uma alternativa às técnicas referidas anteriormente são os procedimentos que permitem o aumento da degradação da proteína mutada, por indução da autofagia ou da via ubiquitina-proteassoma. Um éster da rapamicina, o temsirolimus, aumenta a degradação da ATXN3, reduz o número de agregados e melhora o fenótipo motor de um modelo da DMJ em ratinhos por aumento da autofagia (199). Outro aspeto que suporta a indução de autofagia como terapêutica eficaz é o facto da sobreexpressão da proteína beclina-1 aumentar a degradação da proteína ATXN3 mutada, diminuir os agregados por ela formados e melhorar coordenação motora em modelos de ratinho principalmente quando administrada em fases iniciais da doença (200).

Recentemente, o composto H1152, através da indução do proteassoma conseguiu reduzir os níveis da ATXN3 mutada e mostrou capacidade de redução da morte neuronal e do fenótipo neurológico de ratinhos DMJ (201).

Um outro estudo mostrou a possibilidade da utilização do lítio num modelo DMJ em *Drosophila* (202). Este composto foi utilizado num estudo clinico fase II/III mas, segundo os resultados publicados, não provocou alterações significativas na progressão da doença utilizando a escala “Neurological Examination Score for the Assessment of Spinocerebellar Ataxia” (NESSCA) após 48 semanas de estudo. Contudo, o estudo foi limitado no tempo e em termos de amostra (62 doentes divididos por dois grupos de estudo) (203).

À medida que o mecanismo patogénico vai sendo desvendado, outras estratégias possíveis vão surgindo, já que certos elementos chave da patologia que participam na formação de agregados, desregulação da transcrição, alterações da sinalização e dos padrões de interação proteica podem ser sérios candidatos a alvos terapêuticos. Outros candidatos a alvos terapêuticos na DMJ são também os genes modificadores da doença. Por exemplo, sabe-se que as proteínas *chaperones* podem neutralizar a toxicidade induzida por proteínas *misfolded* ou por agregados *in vitro* e *in vivo* e por isso tornam-se um alvo terapêutico atrativo (149, 204-205). Por exemplo, em *Drosophila* e *C. elegans* foi observada diminuição da agregação da ATXN3 após tratamento com o composto 17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG), um inibidor da HSP90 (*heat shock protein*) que aumenta a expressão de várias *chaperones* (206-207). Um composto análogo o 17-DMAG utilizado em ratinhos DMJ fez com que melhorassem os aspetos motores, para além da diminuição da proteína mutada e redução dos agregados nucleares. Contudo, embora tenha havido um atraso do aparecimento dos défices motores em 8 semanas, o efeito protetor foi perdido às 30 semanas de vida destes ratinhos DMJ (208).

Na tentativa de diminuir a produção de fragmentos tóxicos da ATXN3 pelas calpainas, um grupo de trabalho testou a sua inibição pela calpastatina, em modelos de ratinho transgénico DMJ, verificando uma diminuição da toxicidade e da agregação proteica (209). Da mesma forma, num outro modelo de ratinho DMJ quando os inibidores endógenos das calpainas são retirados o número de agregados nucleares aumenta, assim como, a neurodegeneração havendo agravamento do fenótipo dos animais (182).

Outra possibilidade em estudo tem como objetivo atuar na desregulação da transcrição, outro mecanismo alterado na DMJ, focando-se na reversão da hipoacetilação das histonas H3/H4 em ratinhos DMJ tratados com butirato de sódio, um inibidor da desacetilação de histonas (HDAC). Este composto conseguiu induzir um atraso no aparecimento dos sintomas, aumento da sobrevida e progresso na

performance motora (210). Outro inibidor HDAC, o valproato foi testado em vários modelos DMJ com sucesso, com a vantagem de já ser usado há várias décadas em doentes com epilepsia e doença bipolar, sendo portanto um composto seguro e bem tolerado (206, 211). Uma vez que, é possível que, a homeostasia do cálcio esteja alterada na DMJ, uma outra estratégia foi analisada em ratinhos DMJ, utilizando Dantroleno com o objetivo de estabilizar a sinalização do Ca^+ intracelular, permitindo uma melhoria do fenótipo motor e redução da perda neuronal (212). Um ativador de canais de potássio dependentes do cálcio, o SKA-31 conseguiu, para além de melhorar a função motora de ratinhos DMJ, corrigir as alterações na despolarização das células Purkinje (213).

Por último, foi descrita a possibilidade da cafeína através do antagonismo dos recetores Adenosina A2_A conseguir diminuir a neuropatologia num modelo ratinho SCA3 (214). Devido à sua administração segura os autores propõem que esta substância possa ser implementada como medida profilática.

Os trabalhos referidos anteriormente mostram todo o esforço que nos últimos anos tem vindo a ser aplicado no sentido de se encontrar o tratamento da DMJ. Embora haja ainda um longo percurso a percorrer, o elevado número de trabalhos publicados nos últimos anos e os resultados por eles revelados criaram a expectativa de que é possível encontrar uma cura para esta doença devastadora num futuro próximo. Qualquer fármaco que possa ser utilizado na prevenção ou tratamento da DMJ muito provavelmente terá sucesso em outras doenças de poliglutaminas tais como a Doença de Huntington.

Conclusão

Este ano completam-se 20 anos desde que foi descoberto o gene *MJD1/ATXN3* responsável pela DMJ. A partir dessa extraordinária descoberta passou a ser possível oferecer aos doentes a confirmação molecular do diagnóstico clínico e disponibilizar testes preditivos aos familiares em risco. Para além disso, a descoberta da mutação responsável pela doença, um segmento de repetições de CAGs permitiu integrar a DMJ num leque de nove doenças neurodegenerativas designada no seu conjunto de doenças de poliglutaminas. Esta classe, que inclui igualmente a doença de Huntington tem sido extensivamente estudada, pela particularidade de terem por base proteínas contendo segmentos repetitivos de glutaminas que lhes confere propriedades tóxicas e que as leva a precipitar em inclusões neuronais. A possibilidade de haver um mecanismo neurotóxico comum a estas doenças foi apoiada pela presença de inclusões intracelulares em todas estas doenças. Se inicialmente parecia óbvio que os agregados eram tóxicos, atualmente coloca-se a hipótese de estes serem um epifenómeno ou até mesmo um processo benéfico para a célula. Na verdade, só o cabal esclarecimento da função das proteínas envolvidas em cada uma destas patologias e da forma como o segmento poliglutaminas pode alterar essa mesma função vai permitir o conhecimento do mecanismo patogénico subjacente. Assim, a *ATXN3* passou a ser alvo dos mais variados estudos estruturais e de função e atualmente sabe-se que atua como enzima de desubiquitinação participando em mecanismo de homeostasia celular e na regulação da transcrição. Nos últimos anos, foram criados inúmeros modelos celulares e animais na tentativa de recriarem a DMJ. Estes modelos permitiram o reconhecimento da participação da *ATXN3* em diversos mecanismos celulares e oferecem uma oportunidade única de se testarem diversas estratégias terapêuticas preventivas. Estas estratégias atualmente estão focadas na tentativa de silenciar a expressão do gene mutado ou diminuir os níveis da proteína alterada. Em alternativa, estão a ser testados agentes farmacológicos que possam interferir nas vias celulares provavelmente envolvidas na patogénese da doença.

Por enquanto, pode ser oferecido aos doentes aconselhamento genético e apoio psicossocial, tratamentos farmacológicos e não farmacológicos que aliviem os seus sintomas.

Apesar do longo caminho percorrido, e dos resultados promissores entretanto obtidos é ainda necessário ultrapassar várias etapas até que se possam iniciar ensaios clínico em doentes DMJ. Na verdade, há uma forte esperança de que estratégias terapêuticas bem sucedidas em qualquer uma das doenças de poliglutaminas possam ser utilizada na prevenção/tratamento das restantes doenças dessa classe.

Bibliografia

1. Kremer EJ, Pritchard M, Lynch M, et al. Mapping of DNA instability at the Fragile X to a trinucleotide repeat sequence (pCCG)_n. *Science* 1991;252:1711-1714.
2. Oberle I, Rousseau F, Heitz D, et al. Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* 1991;252:1097-1102.
3. Verkerk AJMH, Pieretti M, Sutcliffe JS, et al. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* 1991;65:905-914.
4. Yu S, Pritchard M, Kremer E, et al. Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA. *Science* 1991;252:1179-1181.
5. Brook JD, McCurrach ME, Harley HG, et al. Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* 1992;68:799-808.
6. Buxton J, Schelbourne P, Davies J, et al. Detection of an unstable fragment of DNA specific to individuals with myotonic dystrophy. *Nature* 1992;355:547-548.
7. Fu YH, Pizzuti A, Fenwick RG, et al. An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science* 1992;255:1256-1259.
8. Mahadevan M, Tsilfidis C, Sabourin L, et al. Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3'untranslated region of the gene. *Science* 1992;255:1253-1255.
9. Zoghbi HY and Orr HT. Glutamine repeat and neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci* 2000;23:217-247.
10. Nakano KK, Dawson DM and Spence A. Machado disease. A hereditary ataxia in Portuguese emigrants to Massachusetts. *Neurology* 1972;22:49-55.
11. Woods BT and Schaumburg HH. Nigro-spino-dentatal degeneration with nuclear ophthalmoplegia. A unique and partially treatable clinico-pathological entity. *J Neurol Sci* 1972;17:149-166.
12. Rosenberg RN, Nyhan WL, Bay C and Shore P. Autosomal dominant striatonigral degeneration. A clinical, pathologic, and biochemical study of a new genetic disorder. *Neurology* 1976;26:703-714.
13. Romanul FC, Fowler HL, Radvany J, Feldman RG and Feingold M. Azorean disease of the nervous system. *N Engl J Med* 1977;296:1505-1508.
14. Coutinho P and Andrade C. Autosomal dominant system degeneration in Portuguese families of Azores Islands. *Neurology* 1978;28:703-709.
15. Lima L and Coutinho P. Clinical criteria for diagnosis of Machado-Joseph disease: report of a non-Azorean Portuguese family. *Neurology* 1980;30:319-322.
16. Stevanin G, Sousa PS, Cancel G, et al. The gene for Machado-Joseph disease maps to the same 3-cM interval as the spinal cerebellar ataxia 3 gene on chromosome 14q. *Neurobiol Dis* 1994;1:79-82.
17. Twist EC, Causaubon LK, Ruttledge M, et al. Machado Joseph disease maps to the same region of chromosome 14 as the spinocerebellar ataxia type 3 locus. *J Med Genet* 1995;32:25-31.
18. Bettencourt C and Lima M. Machado-Joseph Disease: from first descriptions to new perspectives. *Orphanet J Rare Dis* 2011;6:35.
19. Teive HA, Munhoz RP, Raskin S and Werneck LC. Spinocerebellar ataxia type 6 in Brazil. *Arq Neuropsiquiatr* 2008;66:691-4.
20. Jardim LB, Silveira I, Pereira ML, et al. A survey of spinocerebellar ataxia in South Brazil - 66 new cases with Machado-Joseph disease, SCA7, SCA8, or unidentified disease-causing mutations. *J Neurol* 2001;248:870-6.

21. Vale J, Bugalho O, Silveira I, Sequeiros J, Guimaraes J and Coutinho P. Autosomal dominant cerebellar ataxia: frequency analysis and clinical characterization of 45 families from Portugal. *Eur J Neurol* 2010;17:124-128.
22. Silveira I, Coutinho P, Maciel P, et al. Analysis of SCA1, DRPLA, MJD, SCA2, and SCA6 CAG repeats in 48 Portuguese ataxia families. *Am J Med Genet* 1998;81:134-138.
23. Zhao Y, Tan EK, Law HY, Yoon CS, Wong MC and Ng I. Prevalence and ethnic differences of autosomal-dominant cerebellar ataxia in Singapore. *Clin Genet* 2002;62:478-81.
24. Tang B, Liu C, Shen L, et al. Frequency of SCA1, SCA2, SCA3/MJD, SCA6, SCA7, and DRPLA CAG trinucleotide repeat expansion in patients with hereditary spinocerebellar ataxia from Chinese kindreds. *Arch Neurol* 2000;57:540-4.
25. Jiang H, Tang BS, Xu B, et al. Frequency analysis of autosomal dominant spinocerebellar ataxias in mainland Chinese patients and clinical and molecular characterization of spinocerebellar ataxia type 6. *Chin Med J (Engl)* 2005;118:837-43.
26. van de Warrenburg BP, Sinke RJ, Verschuuren-Bemelmans CC, et al. Spinocerebellar ataxias in the Netherlands: prevalence and age at onset variance analysis. *Neurology* 2002;58:702-8.
27. Schols L, Amoiridis G, Buttner T, Przuntek H, Epplen JT and Riess O. Autosomal dominant cerebellar ataxia: phenotypic differences in genetically defined subtypes? *Ann Neurol* 1997;42:924-32.
28. Maruyama H, Izumi Y, Morino H, et al. Difference in disease-free survival curve and regional distribution according to subtype of spinocerebellar ataxia: a study of 1,286 Japanese patients. *Am J Med Genet* 2002;114:578-83.
29. Shibata-Hamaguchi A, Ishida C, Iwasa K and Yamada M. Prevalence of spinocerebellar degenerations in the Hokuriku district in Japan. *Neuroepidemiology* 2009;32:176-83.
30. Coutinho P. Doença de Machado-Joseph. Tentativa de definição. Tese-Universidade do Porto 1992;
31. Maciel P, Costa MC, Ferro A, et al. Improvement in the molecular diagnosis of Machado-Joseph disease. *Arch Neurol* 2001;58:1821-1827.
32. Bettencourt C, Santos C, Kay T, Vasconcelos J and Lima M. Analysis of segregation patterns in Machado-Joseph disease pedigrees. *J Hum Genet* 2008;53:920-3.
33. Sequeiros J and Coutinho P. Epidemiology and clinical aspects of Machado-Joseph disease. *Adv Neurol* 1993;61:139-153.
34. Jardim LB, Pereira ML, Silveira I, Ferro A, Sequeiros J and Giugliani R. Neurologic findings in Machado-Joseph disease: relation with disease duration, subtypes, and (CAG)n. *Arch Neurol* 2001;58:899-904.
35. Raposo M, Vasconcelos J, Bettencourt C, Kay T, Coutinho P and Lima M. Nystagmus as an early ocular alteration in Machado-Joseph disease (MJD/SCA3). *BMC Neurology* 2014;14:17.
36. Friedman JH and Amick MM. Fatigue and daytime somnolence in Machado Joseph Disease (spinocerebellar ataxia type 3). *Mov Disord* 2008;23:1323-4.
37. Pedroso JL, Franca MC, Jr., Braga-Neto P, et al. Nonmotor and extracerebellar features in Machado-Joseph disease: a review. *Mov Disord* 2013;28:1200-1208.
38. Pedroso JL, Braga-Neto P, Felício AC, et al. Sleep disorders in Machado-Joseph disease: frequency, discriminative thresholds, predictive values, and correlation with ataxia-related motor and non-motor features. *Cerebellum* 2011;10:291-295.

39. D'Abreu A, Franca M, Jr., Conz L, et al. Sleep symptoms and their clinical correlates in Machado-Joseph disease. *Acta Neurol Scand* 2009;119:277-280.
40. Schols L, Haan J, Riess O, Amoiridis G and Przuntek H. Sleep disturbance in spinocerebellar ataxias: is the SCA3 mutation a cause of restless legs syndrome? *Neurology* 1998;51:1603-1607.
41. Friedman JH. Presumed rapid eye movement behavior disorder in Machado-Joseph disease (spinocerebellar ataxia type 3). *Mov Disord* 2002;17:1350-1353.
42. Friedman JH, Fernandez HH and Sudarsky LR. REM behavior disorder and excessive daytime somnolence in Machado-Joseph disease (SCA-3). *Mov Disord* 2003;18:1520-1522.
43. Iranzo A, Munoz E, Santamaria J, Vilaseca I, Mila M and Tolosa E. REM sleep behavior disorder and vocal cord paralysis in Machado-Joseph disease. *Mov Disord* 2003;18:1179-1183.
44. Paulson H. Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3. *Handb Clin Neurol* 2012;103:437-449.
45. Tuite P, Rogaeva E, St George-Hyslop P and Lang A. Dopa-responsive Parkinsonism phenotype of Machado-Joseph disease: confirmation of 14q CAG expansion. *Ann Neurol* 1995;38:684-687.
46. Durr A, Stevanin G, Cancel G, et al. Spinocerebellar ataxia 3 and Machado-Joseph disease: clinical, molecular, and neuropathological features. *Ann Neurol* 1996;39:490-499.
47. Marmolino D and Manto M. Past, present and future therapeutics for cerebellar ataxias. *Curr Neuroparmacol* 2010;8:41-61.
48. Bettencourt C, Santos C, Coutinho P, et al. Parkinsonian phenotype in Machado-Joseph disease (MJD/SCA3): a two-case report. *BMC Neurol* 2011;11:131.
49. Sakai T and kawakami H. Machado-Joseph disease. A proposal os spastic paraplegic subtype. *Neurology* 1996;46:846-847.
50. Iwabuchi K, Tsuchiya K, Uchihara T and Yagishita S. Autosomal dominant spinocerebellar degenerations. Clinical, pathological, and genetic correlations. *Rev Neurol (Paris)* 1999;155:255-270.
51. Rub U, de Vos RA, Schultz C, Brunt ER, Paulson H and Braak H. Spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease): severe destruction of the lateral reticular nucleus. *Brain* 2002;125:2115-2124.
52. Rub U, Brunt ER, Gierga K, et al. The nucleus raphe interpositus in spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease). *J Chem Neuroanat* 2003;25:115-127.
53. Coutinho P, Guimarães A and Scaravilli F. The pathology of Machado-Joseph disease: report of a possible homozygous case. *Acta Neuropathol* 1982;58:48-54.
54. Koeppen AH, Dickson AC, Lamarche JB and Robitaille Y. Synapses in the hereditary ataxias. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999;58:748-764.
55. Rub U, Brunt ER and Deller T. New insights into the pathoanatomy of spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease). *Curr Opin Neurol* 2008;21:111-116.
56. Klockgether T, Skalej M, Wedekind D, et al. Autosomal dominant cerebellar ataxia type I. MRI-based volumetry of posterior fossa structures and basal ganglia in spinocerebellar ataxia types 1, 2 and 3. *Brain* 1998;121 (Pt 9):1687-1693.
57. Murata Y, Yamaguchi S, Kawakami H, et al. Characteristic magnetic resonance imaging findings in Machado-Joseph disease. *Arch Neurol* 1998;55:33-37.
58. Taniwaki T, Sakai T, Kobayashi T, et al. Positron emission tomography (PET) in Machado-Joseph disease. *J Neurol Sci* 1997;145:63-67.

59. Etchebehere EC, Caron M, Pereira JA, et al. Activation of the growth plates on three-phase bone scintigraphy: the explanation for the overgrowth of fractured femurs. *Eur J Nucl Med* 2001;28:72-80.
60. Yoshizawa T, Watanabe M, Frusho K and Shoji S. Magnetic resonance imaging demonstrates differential atrophy of pontine base and tegmentum in Machado-Joseph disease. *J Neurol Sci* 2003;215:45-50.
61. de Oliveira MS, D'Abreu A, Franca MC, Jr., Lopes-Cendes I, Cendes F and Castellano G. MRI-texture analysis of corpus callosum, thalamus, putamen, and caudate in Machado-Joseph disease. *J Neuroimaging* 2010;22:46-52.
62. D'Abreu A, Franca M, Jr., Appenzeller S, Lopes-Cendes I and Cendes F. Axonal dysfunction in the deep white matter in Machado-Joseph disease. *J Neuroimaging* 2009;19:9-12.
63. Soong BW and Liu RS. Positron emission tomography in asymptomatic gene carriers of Machado-Joseph disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998;64:499-504.
64. Paulson HL, Perez MK, Trotter Y, et al. Intranuclear inclusions of expanded polyglutamine protein in spinocerebellar ataxia type 3. *Neuron* 1997;19:333-344.
65. Schmidt T, Landwehrmeyer GB, Schmitt I, et al. An isoform of ataxin-3 accumulates in the nucleus of neuronal cells in affected brain regions of SCA3 patients. *Brain Pathol* 1998;8:669-679.
66. Becher MW, Kotzuk JA, Sharp AH, et al. Intranuclear neuronal inclusions in Huntington's disease and dentatorubral and pallidolysian atrophy: correlation between the density of inclusions and IT15 CAG triplet repeat length. *Neurobiol Dis* 1998;4:387-397.
67. Chai Y, Koppenhafer SL, Shoesmith SJ, Perez MK and Paulson HL. Evidence for proteasome involvement in polyglutamine disease: localization to nuclear inclusions in SCA3/MJD and suppression of polyglutamine aggregation in vitro. *Hum Mol Genet* 1999;8:673-682.
68. Cummings CJ, Mancini MA, Antalffy B, DeFranco DB, Orr HT and Zoghbi HY. Chaperone suppression of aggregation and altered subcellular proteasome localization imply protein misfolding in SCA1. *Nature* 1998;395:148-154.
69. Takahashi J, Tanaka J, Arai K, et al. Recruitment of nonexpanded polyglutamine proteins to intranuclear aggregates in neuronal intranuclear hyaline inclusion disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001;60:369-376.
70. Stenoien DL, Cummings CJ, Adams HP, et al. Polyglutamine-expanded androgen receptors form aggregates that sequester heat shock proteins, proteasome components and SRC-1, and are suppressed by the HDJ-2 chaperone. *Hum Mol Genet* 1999;8:731-741.
71. Mori F, Nishie M, Piao YS, et al. Accumulation of NEDD8 in neuronal and glial inclusions of neurodegenerative disorders. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2005;31:53-61.
72. Yamada M, Tan CF, Inenaga C, Tsuji S and Takahashi H. Sharing of polyglutamine localization by the neuronal nucleus and cytoplasm in CAG-repeat diseases. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2004;30:665-675.
73. Rub U, de Vos RA, Brunt ER, et al. Spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3): thalamic neurodegeneration occurs independently from thalamic ataxin-3 immunopositive neuronal intranuclear inclusions. *Brain Pathol* 2006;16:218-227.
74. Hayashi M, Kobayashi K and Furuta H. Immunohistochemical study of neuronal intranuclear and cytoplasmic inclusions in Machado-Joseph disease. *Psychiatry Clin Neurosci* 2003;57:205-213.
75. Yamada M, Sato T, Tsuji S and Takahashi H. CAG repeat disorder models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol* 2008;115:71-86.

76. Seidel K, den Dunnen WF, Schultz C, et al. Axonal inclusions in spinocerebellar ataxia type 3. *Acta Neuropathol* 2010;120:449-460.
77. Takiyama Y, Nishizama M, Kawashima S, et al. The gene for Machado-Joseph disease maps to human chromosome 14q. *Nat Genet* 1993;4:300-304.
78. Sequeiros J, Silveira I, Maciel P, Coutinho P and al. e. Genetic linkage studies of Machado-Joseph disease with chromosome 14q STRPs in 16 Portuguese-Azorean kindreds. *Genomics* 1994;21:645-648.
79. Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, et al. CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat Genet* 1994;8:221-228.
80. Maciel P, Gaspar C, DeStefano AL, et al. Correlation between CAG repeat length and clinical features in Machado-Joseph disease. *Am J Hum Genet* 1995;57:54-61.
81. Silveira I, Lopes-Cendes I, Kish S, et al. Frequency of spinocerebellar ataxia type 1, dentatorubropallidoluysian atrophy, and Machado-Joseph disease mutations in a large group of spinocerebellar ataxia patients. *Neurology* 1996;46:214-218.
82. Takiyama Y, Sakoe K, Nakano I and Nishizawa M. Machado-Joseph disease: cerebellar ataxia and autonomic dysfunction in a patient with the shortest known expanded allele (56 CAG repeat units) of the MJD1 gene. *Neurology* 1997;49:604-606.
83. van Alfen N, Sinke RJ, Zwarts MJ, et al. Intermediate CAG repeat lengths (53,54) for MJD/SCA3 are associated with an abnormal phenotype. *Ann Neurol* 2001;49:805-807.
84. Gu W, Ma H, Wang K, et al. The shortest expanded allele of the MJD1 gene in a Chinese MJD kindred with autonomic dysfunction. *Eur Neurol* 2004;52:107-111.
85. Padiath QS, Srivastava AK, Roy S, Jain S and Brahmachari SK. Identification of a novel 45 repeat unstable allele associated with a disease phenotype at the MJD1/SCA3 locus. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2005;133B:124-126.
86. Ichikawa Y, Goto J, Hattori M, et al. The genomic structure and expression of MJD, the Machado-Joseph disease gene. *J Hum Genet* 2001;46:413-422.
87. Goto J, Watanabe M, Ichikawa Y, et al. Machado-Joseph disease gene products carrying different carboxyl termini. *Neurosci Res* 1997;28:373-377.
88. Maciel P, Gaspar C, Guimaraes L, et al. Study of three intragenic polymorphisms in the Machado-Joseph disease gene (MJD1) in relation to genetic instability of the (CAG)_n tract. *Eur J Hum Genet* 1999;7:147-156.
89. Bettencourt C, Santos C, Montiel R, et al. Increased transcript diversity: novel splicing variants of Machado-Joseph disease gene (ATXN3). *Neurogenetics* 2010;11:193-202.
90. Maciel P, Lopes-Cendes I, Kish S, Sequeiros J and Rouleau GA. Mosaicism of the CAG repeat in CNS tissue in relation to age at death in spinocerebellar ataxia type 1 and Machado-Joseph disease patients. *Am J Hum Genet* 1997;60:993-996.
91. Lerer I, Merims D, Abeliovich D, Zlotogora J and Gadoth N. Machado-Joseph disease: correlation between the clinical features, the CAG repeat length and homozygosity for the mutation. *Eur J Hum Genet* 1996;4:3-7.
92. Takiyama Y, Igarashi S, Rogaeva EA, et al. Evidence for inter-generational instability in the CAG repeat in the MJD1 gene and for conserved haplotypes at flanking markers amongst Japanese and Caucasian subjects with Machado-Joseph disease. *Hum Mol Genet* 1995;4:1137-1146.
93. Carvalho DR, La Rocque-Ferreira A, Rizzo IM, Imamura EU and Speck-Martins CE. Homozygosity enhances severity in spinocerebellar ataxia type 3. *Pediatr Neurol* 2008;38:296-299.

94. Fukutake T, Shinotoh H, Nishino H, et al. Homozygous Machado-Joseph disease presenting as REM sleep behaviour disorder and prominent psychiatric symptoms. *Eur J Neurol* 2002;9:97-100.
95. Lang AE, Rogaeva EA, Tsuda T, Hutterer J and St George-Hyslop P. Homozygous inheritance of the Machado-Joseph disease gene. *Ann Neurol* 1994;36:443-447.
96. Sobue G, Doyu M, Nakao N, et al. Homozygosity for Machado-Joseph disease gene enhances phenotypic severity. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996;60:354-356.
97. Costa MC, Gomes-da-Silva J, Miranda C, Sequeiros J, Santos MM and Maciel P. Genomic structure, promoter activity, and developmental expression of the mouse homologue of the Machado-Joseph disease (MJD) gene. *Genomics* 2004;84:361-373.
98. Rodrigues AJ, Coppola G, Santos C, et al. Functional genomics and biochemical characterization of the *C. elegans* orthologue of the Machado-Joseph disease protein ataxin-3. *Faseb J* 2007;21:1126-1136.
99. Harris GM, Dodelzon K, Gong L, Gonzalez-Alegre P and Paulson HL. Splice isoforms of the polyglutamine disease protein ataxin-3 exhibit similar enzymatic yet different aggregation properties. *PLoS One* 2010;5:e13695.
100. Nishiyama K, Murayama S, Goto J, et al. Regional and cellular expression of the Machado-Joseph disease gene in brains of normal and affected individuals. *Ann Neurol* 1996;40:776-781.
101. Paulson HL, Das SS, Crino PB, et al. Machado-Joseph disease gene product is a cytoplasmic protein widely expressed in brain. *Ann Neurol* 1997;41:453-462.
102. Wang G, Ide K, Nukina N, et al. Machado-Joseph disease gene product identified in lymphocytes and brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;233:476-479.
103. Tait D, Riccio M, Sittler A, et al. Ataxin-3 is transported into the nucleus and associates with the nuclear matrix. *Hum Mol Genet* 1998;7:991-997.
104. Schmitt I, Evert BO, Khazneh H, Klockgether T and Wuellner U. The human MJD gene: genomic structure and functional characterization of the promoter region. *Gene* 2003;314:81-88.
105. Trottier Y, Cancel G, An-Gourfinkel I, et al. Heterogeneous intracellular localization and expression of ataxin-3. *Neurobiol Dis* 1998;5:335-347.
106. Evert BO, Wullner U, Schulz JB, et al. High level expression of expanded full-length ataxin-3 in vitro causes cell death and formation of intranuclear inclusions in neuronal cells. *Hum Mol Genet* 1999;8:1169-1176.
107. Chai Y, Shao J, Miller VM, Williams A and Paulson HL. Live-cell imaging reveals divergent intracellular dynamics of polyglutamine disease proteins and supports a sequestration model of pathogenesis. *Proc Nat Acad Sci USA* 2002;99:9310-9315.
108. Goti D, Katzen SM, Mez J, et al. A mutant ataxin-3 putative-cleavage fragment in brains of Machado-Joseph disease patients and transgenic mice is cytotoxic above a critical concentration. *J Neurosci* 2004;24:10266-10279.
109. Antony PM, Mantele S, Mollenkopf P, et al. Identification and functional dissection of localization signals within ataxin-3. *Neurobiol Dis* 2009;36:280-292.
110. Masino L, Musi V, Menon P, et al. Domain architecture of the polyglutamine protein ataxin-3: a globular domain followed by a flexible tail. *FEBS Letters* 2003;549:21-25.
111. Masino L, Nicastro G, Menon RP, Dal Piaz F, Calder L and Pastore A. Characterization of the structure and the amyloidogenic properties of the Josephin domain of the polyglutamine-containing protein ataxin-3. *J Mol Biol* 2004;344:1021-1035.

112. Chow MK, Mackay JP, Whisstock JC, Scanlon MJ and Bottomley SP. Structural and functional analysis of the Josephin domain of the polyglutamine protein ataxin-3. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;322:387-394.
113. Scheel H, Tomiuk S and Hofmann K. Elucidation of ataxin-3 and ataxin-7 function by integrative bioinformatics. *Hum Mol Genet* 2003;12:2845-2852.
114. Burnett B, Li F and Pittman RN. The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin-3 binds polyubiquitylated proteins and has ubiquitin protease activity. *Hum Mol Genet* 2003;12:3195-3205.
115. Nicastro G, Menon RP, Masino L, Knowles PP, McDonald NQ and Pastore A. The solution structure of the Josephin domain of ataxin-3: structural determinants for molecular recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:10493-10498.
116. Mao Y, Senic-Matuglia F, Di Fiore PP, Polo S, Hodsdon ME and De Camilli P. Deubiquitinating function of ataxin-3: insights from the solution structure of the Josephin domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:12700-12705.
117. Nicastro G, Masino L, Esposito V, et al. Josephin domain of ataxin-3 contains two distinct ubiquitin-binding sites. *Biopolymers* 2009;91:1203-1214.
118. Hofmann K and Falquet L. A ubiquitin-interacting motif conserved in components of the proteasomal and lysosomal protein degradation systems. *Trends Biochem Sci* 2001;26:347-350.
119. Donaldson KM, Li W, Ching KA, Batalov S, Tsai C-C and Joazeiro CAP. Ubiquitin-mediated sequestration of normal cellular proteins into polyglutamine aggregates. *Proc Nat Acad Sci USA* 2003;100:8892-8897.
120. Doss-Pepe EW, Stenroos ES, Johnson WG and Madura K. Ataxin-3 interactions with Rad23 and Valosin-Containing protein and its association with ubiquitin chains and the proteasome are consistent with a role in ubiquitin-mediated proteolysis. *Mol and Cell Biol* 2003;23:6469-6483.
121. Chai Y, Berke SS, Cohen RE and Paulson HL. Poly-ubiquitin binding by the polyglutamine disease protein ataxin-3 links its normal function to protein surveillance pathways. *J Biol Chem* 2004;279:3605-3611.
122. Miller SLH, Malotky E and O'Bryan JP. Analysis of the role of ubiquitin-interacting motifs in ubiquitin binding and ubiquitylation. *J Biol Chem* 2004;279:33528-33537.
123. Berke SJ, Chai Y, Marrs GL, Wen H and Paulson HL. Defining the role of ubiquitin-interacting motifs in the polyglutamine disease protein, ataxin-3. *J Biol Chem* 2005;280:32026-32034.
124. Schmitt I, Linden M, Khazneh H, et al. Inactivation of the mouse *Atxn3* (ataxin-3) gene increases protein ubiquitination. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;362:734-739.
125. Burnett BG and Pittman RN. The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin 3 regulates aggresome formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:4330-4335.
126. Nicastro G, Todi SV, Karaca E, Bonvin AM, Paulson HL and Pastore A. Understanding the role of the Josephin domain in the PolyUb binding and cleavage properties of ataxin-3. *PLoS One* 2010;5:e12430.
127. Winborn BJ, Travis SM, Todi SV, et al. The deubiquitinating enzyme ataxin-3, a polyglutamine disease protein, edits Lys63 linkages in mixed linkage ubiquitin chains. *J Biol Chem* 2008;283:26436-26443.
128. Wang G, Sawai N, Kotliarova S, Kanazawa I and Nukina N. Ataxin-3, the MJD1 gene product, interacts with the two human homologs of yeast DNA repair protein RAD23, HHR23A and HHR23B. *Hum Mol Genet* 2000;9:1795-1803.

129. Schaubert C, Chen L, Tongaonkar P, et al. Rad23 links DNA repair to the ubiquitin/proteasome pathway. *Nature* 1998;391:715-718.
130. Bertolaet BL, Clarke DJ, Wolff M, et al. UBA domains of DNA damage-inducible proteins interact with ubiquitin. *Nat Struct Biol* 2001;8:417-422.
131. Chen L and Madura K. Rad23 promotes the targeting of proteolytic substrates to the proteasome. *Mol and Cell Biol* 2002;22:4902-4913.
132. Wilkinson CR, Seeger M, Hartmann-Petersen R, et al. Proteins containing the UBA domain are able to bind to multi-ubiquitin chains. *Nature Cell Biology* 2001;3:939-943.
133. Ortolan TG, Tongaonkar P, Lambertson D, Chen L, Schaubert C and Madura K. The DNA repair protein Rad23 is a negative regulator of multi-ubiquitin chain assembly. *Nature Cell Biology* 2000;2:601-608.
134. Hirabayashi M, Inoue K, Tanaka K, et al. VCP/p97 in abnormal protein aggregates, cytoplasmic vacuoles, and cell death, phenotypes relevant to neurodegeneration. *Cell Death and Differentiation* 2001;8:977-984.
135. Tsai YC, Fishman PS, Thakor NV and Oyler GA. Parkin facilitates the elimination of expanded polyglutamine proteins and leads to preservation of proteasome function. *J Biol Chem* 2003;278:22044-22055.
136. Matsumoto M, Masayoshi Y, Hatakeyama S, et al. Molecular clearance of ataxin-3 is regulated by mammalian E4. *EMBO J* 2004;23:659-669.
137. Wang Q, Li L and Ye Y. Regulation of retrotranslocation by p97-associated deubiquitinating enzyme ataxin-3. *J Cell Biol* 2006;174:963-971.
138. Zhong X and Pittman RN. Ataxin-3 binds VCP/p97 and regulates retrotranslocation of ERAD substrates. *Hum Mol Genet* 2006;15:2409-2420.
139. Heir R, Ablasou C, Dumontier E, Elliott M, Fagotto-Kaufmann C and Bedford FK. The UBL domain of PLIC-1 regulates aggresome formation. *EMBO Rep* 2006;7:1252-1258.
140. Rodrigues AJ, do Carmo Costa M, Silva TL, et al. Absence of ataxin-3 leads to cytoskeletal disorganization and increased cell death. *Biochim Biophys Acta* 2010;1803:1154-1163.
141. Chai Y, Wu L, Griffin JD and Paulson HL. The role of protein composition in specifying nuclear inclusion formation in polyglutamine disease. *J Biol Chem* 2001;276:44889-44897.
142. Li F, Macfarlan T, Pittman RN and Chakravarti D. Ataxin-3 is a histone-binding protein with two independent transcriptional corepressor activities. *J Biol Chem* 2002;277:45004-45012.
143. Evert BO, Araujo J, Vieira-Saecker AM, et al. Ataxin-3 represses transcription via chromatin binding, interaction with histone deacetylase 3, and histone deacetylation. *J Neurosci* 2006;26:11474-11486.
144. do Carmo Costa M, Bajanca F, Rodrigues AJ, et al. Ataxin-3 plays a role in mouse myogenic differentiation through regulation of integrin subunit levels. *PLoS One* 2010;5:e11728.
145. Matos CA, de Macedo-Ribeiro S and Carvalho AL. Polyglutamine diseases: the special case of ataxin-3 and Machado-Joseph disease. *Prog Neurobiol* 2011;95:26-48.
146. Perutz MF, Johnson T, Suzuki M and Finch JT. Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases. *Proc Nat Acad Sci U S A* 1994;91:5355-5358.
147. DiFligia M, Sapp E, Chase KO, et al. Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* 1997;277:1990-1993.

148. Skinner PJ, Koshy BT, Cummings CJ, et al. Ataxin-1 with an expanded glutamine tract alters nuclear matrix-associated structures. *Nature* 1997;389:971-974.
149. Warrick JM, Chan HY, Gray-Board GL, Chai Y, Paulson HL and Bonini NM. Suppression of polyglutamine-mediated neurodegeneration in *Drosophila* by the molecular chaperone HSP70. *Nat Genet* 1999;23:425-428.
150. Chan HY, Warrick JM, Gray-Board GL, Paulson HL and Bonini NM. Mechanisms of chaperone suppression of polyglutamine disease: selectivity, synergy and modulation of protein solubility in *Drosophila*. *Hum Mol Genet* 2000;9:2811-2820.
151. Kobayashi Y, Kume A, Li M, et al. Chaperones Hsp70 and Hsp40 suppress aggregate formation and apoptosis in cultured neuronal cells expressing truncated androgen receptor protein with expanded polyglutamine tract. *J Biol Chem* 2000;275:8772-8778.
152. Kazemi-Esfarjani P and Benzer S. Genetic suppression of polyglutamine toxicity in *Drosophila*. *Science* 2000;287:1837-1840.
153. Cummings CJ, Sun Y, Opal P, et al. Over-expression of inducible HSP70 chaperone suppresses neuropathology and improves motor function in SCA1 mice. *Hum Mol Genet* 2001;10:1511-1518.
154. Li M, Miwa S, Kobayashi Y, et al. Nuclear inclusions of the androgen receptor protein in spinal and bulbar muscular atrophy. *Ann Neurol* 1998;44:249-254.
155. Kuemmerle S, Gutekunst CA, Klein AM, et al. Huntington aggregates may not predict neuronal death in Huntington's disease. *Ann Neurol* 1999;46:842-649.
156. Huynh DP, Del Bigio MR, Ho DH and Pulst SM. Expression of ataxin-2 in brains from normal individuals and patients with Alzheimer's disease and spinocerebellar ataxia 2. *Ann Neurol* 1999;45:232-241.
157. Li M, Nakagomi Y, Kobayashi Y, et al. Nonneural nuclear inclusions of androgen receptor protein in spinal and bulbar muscular atrophy. *Am J Pathol* 1998;153:695-701.
158. Koyano S, Uchihara T, Fujigasaki H, Nakamura A, Yagishita S and Iwabuchi K. Neuronal intranuclear inclusions in spinocerebellar ataxia type 2: triple-labeling immunofluorescent study. *Neurosci Lett* 1999;273:117-120.
159. Gutekunst CA, Li SH, Yi H, et al. Nuclear and neuropil aggregates in Huntington's disease: relationship to neuropathology. *J Neurosci* 1999;19:2522-2534.
160. Arrasate M, Mitra S, Schweitzer ES, Segal MR and Finkbeiner S. Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature* 2004;431:805-810.
161. Bevivino AE and Loll PJ. An expanded glutamine repeat destabilizes native ataxin-3 structure and mediates formation of parallel beta -fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:11955-11960.
162. Ellisdon AM, Thomas B and Bottomley SP. The two-stage pathway of ataxin-3 fibrillogenesis involves a polyglutamine-independent step. *J Biol Chem* 2006;281:16888-16896.
163. Ellisdon AM, Pearce MC and Bottomley SP. Mechanisms of ataxin-3 misfolding and fibril formation: kinetic analysis of a disease-associated polyglutamine protein. *J Mol Biol* 2007;368:595-605.
164. Kaye R, Head E, Thompson JL, et al. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 2003;300:486-489.
165. Shehi E, Fusi P, Secundo F, Pozzuolo S, Bairati A and Tortora P. Temperature-dependent, irreversible formation of amyloid fibrils by a soluble human ataxin-3 carrying a moderately expanded polyglutamine stretch (Q36). *Biochemistry* 2003;42:14626-14632.

166. Marchal S, Shehi E, Harricane M-C, et al. Structural instability and fibrillar aggregation of non-expanded human ataxin-3 revealed under high pressure and temperature. *J Biol Chem* 2003;278:31554-31563.
167. Chow MK, Paulson HL and Bottomley SP. Destabilization of a non-pathological variant of ataxin-3 results in fibrillogenesis via a partially folded intermediate: a model for misfolding in polyglutamine disease. *J Mol Biol* 2004;335:333-341.
168. Gales L, Cortes L, Almeida C, et al. Towards a structural understanding of the fibrillization pathway in Machado-Joseph's disease: trapping early oligomers of non-expanded ataxin-3. *J Mol Biol* 2005;353:642-654.
169. Kazantsev A, Preisinger E, Dranovsky A, Goldgaber D and Housman D. Insoluble detergent-resistant aggregates form between pathological and nonpathological lengths of polyglutamine in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:11404-11409.
170. Nucifora FC, Sasaki M, Peters MF, et al. Interference by Huntingtin and Atrophin-1 with CBP-mediated transcription leading to cellular toxicity. *Science* 2001;291:2423-2428.
171. McCampbell A, Taylor JP, Taye AA, et al. CREB-binding protein sequestration by expanded polyglutamine. *Hum Mol Genet* 2000;9:2197-2202.
172. Perez MK, Paulson HL, Pendse SJ, Saionz SJ, Bonini NM and Pittman RN. Recruitment and the role of nuclear localization in polyglutamine-mediated aggregation. *J Cell Biol* 1998;143:1457-1470.
173. Gunawardena S, Her LS, Brusch RG, et al. Disruption of axonal transport by loss of huntingtin or expression of pathogenic polyQ proteins in *Drosophila*. *Neuron* 2003;40:25-40.
174. Ikeda H, Yamaguchi M, Sugai S, Aze Y, Narumiya S and Kakizuka A. Expanded polyglutamine in the Machado-Joseph disease protein induces cell death *in vitro* and *in vivo*. *Nat Genet* 1996;13:196-202.
175. Haacke A, Broadley SA, Boteva R, Tzvetkov N, Hartl FU and Breuer P. Proteolytic cleavage of polyglutamine-expanded ataxin-3 is critical for aggregation and sequestration of non-expanded ataxin-3. *Hum Mol Genet* 2006;15:555-568.
176. Berke SJ, Schmied FA, Brunt ER, Ellerby LM and Paulson HL. Caspase-mediated proteolysis of the polyglutamine disease protein ataxin-3. *J Neurochem* 2004;89:908-918.
177. Haacke A, Hartl FU and Breuer P. Calpain inhibition is sufficient to suppress aggregation of polyglutamine-expanded ataxin-3. *J Biol Chem* 2007;282:18851-18856.
178. Jung J, Xu K, Lessing D and Bonini NM. Preventing Ataxin-3 protein cleavage mitigates degeneration in a *Drosophila* model of SCA3. *Hum Mol Genet* 2009;18:4843-4852.
179. Yamamoto Y, Hasegawa H, Tanaka K and Kakizuka A. Isolation of neuronal cells with high processing activity for the Machado-Joseph disease protein. *Cell Death and Differentiation* 2001;8:871-873.
180. Yoshizawa T, Yamagishi Y, Koseki N, et al. Cell cycle arrest enhances the *in vitro* cellular toxicity of the truncated Machado-Joseph disease gene product with an expanded polyglutamine stretch. *Hum Mol Genet* 2000;9:69-78.
181. Colomer Gould VF, Goti D, Pearce D, et al. A mutant ataxin-3 fragment results from processing at a site N-terminal to amino acid 190 in brain of Machado-Joseph disease-like transgenic mice. *Neurobiol Dis* 2007;27:362-369.
182. Hubener J, Weber JJ, Richter C, et al. Calpain-mediated ataxin-3 cleavage in the molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3). *Hum Mol Genet* 2013;22:508-518.

183. Pozzi C, Valtorta M, Tedeschi G, et al. Study of subcellular localization and proteolysis of ataxin-3. *Neurobiol Dis* 2008;30:190-200.
184. Santos C. Genética molecular da doença de Machado-Joseph: modelos de estudo em *C. elegans*. Tese-Universidade do Porto 2005;
185. Steffan JS, Kazantsev A, Spasic-Boskovic O, et al. The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:6763-6768.
186. Shimohata T, Nakajima T, Yamada M and al. e. Expanded polyglutamine stretches interact with TAFII130, interfering with CREB-dependent transcription. *Nat Genet* 2000;26:29-35.
187. Riley BE and Orr HT. Polyglutamine neurodegenerative diseases and regulation of transcription: assembling the puzzle. *Genes Dev* 2006;20:2183-2192.
188. D'Abreu A, Franca MC, Jr., Paulson HL and Lopes-Cendes I. Caring for Machado-Joseph disease: current understanding and how to help patients. *Parkinsonism Relat Disord* 2010;16:2-7.
189. Boy J, Schmidt T, Wolburg H, et al. Reversibility of symptoms in a conditional mouse model of spinocerebellar ataxia type 3. *Hum Mol Genet* 2009;18:4282-4295.
190. Miller VM, Xia H, Marrs GL, et al. Allele-specific silencing of dominant disease genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:7195-7200.
191. Alves S, Nascimento-Ferreira I, Dufour N, et al. Silencing ataxin-3 mitigates degeneration in a rat model of Machado-Joseph disease: no role for wild-type ataxin-3? *Hum Mol Genet* 2010;19:2380-2394.
192. Alves S, Nascimento-Ferreira I, Auregan G, et al. Allele-specific RNA silencing of mutant ataxin-3 mediates neuroprotection in a rat model of Machado-Joseph disease. *PLoS One* 2008;3:e3341.
193. Rodriguez-Lebron E, Costa M, Luna-Cancelon K, et al. Silencing mutant ATXN3 expression resolves molecular phenotypes in SCA3 transgenic mice. *Mol Ther* 2013;21:1909-1918.
194. Nobrega C, Nascimento-Ferreira I, Onofre I, et al. Silencing mutant ataxin-3 rescues motor deficits and neuropathology in Machado-Joseph disease transgenic mice. *PLoS One* 2013;8:e52396.
195. Costa Mdo C, Luna-Cancelon K, Fischer S, et al. Toward RNAi therapy for the polyglutamine disease Machado-Joseph disease. *Mol Ther* 2013;21:1898-1908.
196. Hu J, Matsui M, Gagnon KT, et al. Allele-specific silencing of mutant huntingtin and ataxin-3 genes by targeting expanded CAG repeats in mRNAs. *Nat Biotechnol* 2009;27:478-484.
197. Hu J, Gagnon KT, Liu J, et al. Allele-selective inhibition of ataxin-3 (ATX3) expression by antisense oligomers and duplex RNAs. *Biol Chem* 2011;392:315-325.
198. Evers MM, Tran HD, Zalachoras I, et al. Ataxin-3 protein modification as a treatment strategy for spinocerebellar ataxia type 3: removal of the CAG containing exon. *Neurobiol Dis* 2013;58:49-56.
199. Menzies FM, Huebener J, Renna M, Bonin M, Riess O and Rubinsztein DC. Autophagy induction reduces mutant ataxin-3 levels and toxicity in a mouse model of spinocerebellar ataxia type 3. *Brain* 2010;133:93-104.
200. Nascimento-Ferreira I, Nobrega C, Vasconcelos-Ferreira A, et al. Beclin 1 mitigates motor and neuropathological deficits in genetic mouse models of Machado-Joseph disease. *Brain* 2013;136:2173-2188.
201. Wang HL, Hu SH, Chou AH, Wang SS, Weng YH and Yeh TH. H1152 promotes the degradation of polyglutamine-expanded ataxin-3 or ataxin-7 independently of its

ROCK-inhibiting effect and ameliorates mutant ataxin-3-induced neurodegeneration in the SCA3 transgenic mouse. *Neuropharmacology* 2013;70:1-11.

202. Jia DD, Zhang L, Chen Z, et al. Lithium chloride alleviates neurodegeneration partly by inhibiting activity of GSK3 β in a SCA3 *Drosophila* model. *Cerebellum* 2013;12:892-901.

203. Saute JA, Castilhos RM, Monte TL, et al. A randomized, phase 2 clinical trial of lithium carbonate in Machado-Joseph disease. *Mov Disord* 2014;

204. Chai Y, Koppenhafer SL, Bonini NM and Paulson HL. Analysis of the role of heat shock protein (Hsp) molecular chaperones in polyglutamine disease. *J Neurosci* 1999;19:10338-10347.

205. Schmidt T, Lindenberg KS, Krebs A, et al. Protein surveillance machinery in brains with spinocerebellar ataxia type 3: redistribution and differential recruitment of 26S proteasome subunits and chaperones to neuronal intranuclear inclusions. *Ann Neurol* 2002;51:302-310.

206. Teixeira-Castro A, Ailion M, Jalles A, et al. Neuron-specific proteotoxicity of mutant ataxin-3 in *C. elegans*: rescue by the DAF-16 and HSF-1 pathways. *Hum Mol Genet* 2011;20:2996-3009.

207. Fujikake N, Nagai Y, Popiel HA, Okamoto Y, Yamaguchi M and Toda T. Heat shock transcription factor 1-activating compounds suppress polyglutamine-induced neurodegeneration through induction of multiple molecular chaperones. *J Biol Chem* 2008;283:26188-26197.

208. Silva-Fernandes A, Duarte-Silva S, Neves-Carvalho A, et al. Chronic Treatment with 17-DMAG Improves Balance and Coordination in A New Mouse Model of Machado-Joseph Disease. *Neurotherapeutics* 2014;Jan 30:

209. Simoes AT, Goncalves N, Koeppen A, et al. Calpastatin-mediated inhibition of calpains in the mouse brain prevents mutant ataxin 3 proteolysis, nuclear localization and aggregation, relieving Machado-Joseph disease. *Brain* 2012;135:2428-2439.

210. Chou AH, Chen SY, Yeh TH, Weng YH and Wang HL. HDAC inhibitor sodium butyrate reverses transcriptional downregulation and ameliorates ataxic symptoms in a transgenic mouse model of SCA3. *Neurobiol Dis* 2011;41:481-488.

211. Yi J, Zhang L, Tang B, et al. Sodium valproate alleviates neurodegeneration in SCA3/MJD via suppressing apoptosis and rescuing the hypoacetylation levels of histone H3 and H4. *PLoS One* 2013;8:e54792.

212. Chen X, Tang TS, Tu H, et al. Deranged calcium signaling and neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 3. *J Neurosci* 2008;28:12713-12724.

213. Shakkotai VG, Costa Mdo C, Dell'Orco JM, Sankaranarayanan A, Wulff H and Paulson HL. early changes in cerebellar physiology accompany motor dysfunction in the polyglutamine disease, Spinocerebellar ataxia type 3. *J Neurosci* 2011;31:13002-13014.

214. Goncalves N, Simoes AT, Cunha RA and de Almeida LP. Caffeine and adenosine A(2A) receptor inactivation decrease striatal neuropathology in a lentiviral-based model of Machado-Joseph disease. *Ann Neurol* 2013;73:655-666.

Tabela 1. Lista de doenças causadas por expansão de CAGs/poliglutamina nas regiões codificantes.

Doença	Modo de transmissão	Gene	Locus	Proteína	Tamanho da repetição CAG	
					normal	mutada
Atrofia muscular espino-bulbar (Doença de Kennedy)	recessiva ligada ao X	AR	Xq13-21	receptor de androgénio	9-36	38-66
Doença de Huntington	autossómica dominante	HD	4p16.3	huntingtina	6-35	36-121
Atrofia dentatorubropalidoluysiana (Síndrome de Haw-River)	autossómica dominante	DRPLA	12p13-31	atrofina-1	6-35	49-88
Ataxia espinocerebelosa tipo 1	autossómica dominante	ATXN1	6p23	ataxina-1	6-44	39-82
Ataxia espinocerebelosa tipo 2	autossómica dominante	ATXN2	12q24.1	ataxina-2	15-31	36-63
Ataxia espinocerebelosa tipo 3 (Doença de Machado-Joseph)	autossómica dominante	ATXN3	14q32.1	ataxina-3	12-44	54-86
Ataxia espinocerebelosa tipo 6	autossómica dominante	CACNA1A	19p13	subunidade canal cálcio α 1A	4-18	21-33
Ataxia espinocerebelosa tipo 7	autossómica dominante	ATXN7	13p12-13	ataxina-7	4-35	37-306
Ataxia espinocerebelosa tipo 17	autossómica dominante	TBP	6q27	TATA <i>binding protein</i>	30-42	45-63

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à minha família especialmente aos meus pais por todo o apoio que me deram ao longo destes anos. Ao meu irmão, à minha cunhada Paula e sobrinha Inês agradeço o carinho com que sempre me brindaram.

À Doutora Carolina Garrett agradeço-lhe a disponibilidade e por ter aceite a minha orientação.

Um especial agradecimento aos meus colegas de curso ano 2008/2014 pelo excelente ambiente que me proporcionaram durante estes 6 anos.

Ao Paulo pela compreensão e por ter estado sempre ao meu lado.

Anexos

Anexo

Normas de candidatura Revista SINAPSE

1. Os trabalhos candidatos a publicação serão inéditos, e não deverão ser enviados para outras publicações.
2. Deverão ser remetidos por correio electrónico, em documentos anexos (attached files) Microsoft Word™, em qualquer versão actual.
3. Deverão ser evitados símbolos, sublinhados, palavras em maiúsculas, bolds, itálicos, notas de topo ou de rodapé, e artifícios formais.
4. As páginas não deverão ser numeradas.
5. Deverão ser redigidos em português ou em inglês. Poderão, excepcionalmente, aceitar-se trabalhos em francês ou espanhol.
6. Da primeira página constarão: título do trabalho, nome próprio, apelido, departamento ou serviço, instituição, profissão, cargo, endereço, telemóvel e correio electrónico de todos os autores.
7. A segunda página incluirá: o título do trabalho, o nome dos autores, o resumo, as palavras-chave e o título de cabeçalho; a morada institucional e o endereço de correio electrónico a incorporar no artigo.
8. A terceira página será a versão em inglês da segunda página, se o artigo foi redigido em português (e vice-versa). Se o artigo for redigido em francês ou espanhol, a terceira e quarta página serão versões em português e Inglês, respectivamente.
9. As restantes folhas incluirão as diferentes secções do trabalho. Os trabalhos originais incluirão as seguintes secções: introdução/objectivos, metodologia, resultados, discussão/conclusões e bibliografia. Os casos clínicos serão estruturados em introdução, caso clínico, discussão e bibliografia. As revisões incluirão, pelo menos, introdução, desenvolvimento, conclusões e bibliografia. Os editoriais e as cartas estarão isentos de organização em secções. No texto das secções, a identificação institucional será evitada, podendo ser acrescentada, se imprescindível, no fim do processo de avaliação e antes da publicação do artigo.

10. As tabelas e figuras deverão ser enviadas em documento adicional Microsoft Word™, uma por página, precedidas por uma página que inclua as notas correspondentes. As figuras serão enviadas em ficheiros GIF ou JPEG.

11. Os agradecimentos ou menções particulares constarão em página própria.

12. Os compromissos particulares ou institucionais (patrocínios, financiamentos, bolsas, prémios) serão expressos obrigatoriamente em página adicional.

Regras para elaboração do trabalho

1. Título

Será claro e informativo, representativo do conteúdo do artigo e captando a atenção do leitor. Não terá iniciais ou siglas, nem excederá vinte palavras. Sub-títulos genéricos ou vulgares como “caso clínico” ou “a propósito de um caso clínico” não serão aceites.

2. Autores e instituições

A autoria exige, cumulativamente, contribuições substanciais para:

- a) concepção e desenho, ou aquisição de dados, ou análise e interpretação de dados;
- b) redacção ou revisão crítica de uma parte importante do seu conteúdo intelectual;
- c) responsabilidade pela aprovação da versão final. Cada um dos autores deve ter participado suficientemente no trabalho para assumir responsabilidade pública pelo seu conteúdo. A obtenção de financiamento, a colecção de dados ou a supervisão da equipa de investigação não justificam a autoria. Todas pessoas designadas por autores devem cumprir os critérios; nenhuma pessoa qualificada para autoria deve ser excluída. Membros do grupo de trabalho (coordenadores, directores, técnicos, consultores), que não cumpram os critérios internacionais de autoria, poderão ser listados em “agradecimentos”. O número de autores será parcimonioso, particularmente em “Casos Clínicos”. A inclusão e compromisso do nome das instituições é da responsabilidade dos autores.

3. Resumo

O resumo tem um limite máximo de 400 palavras. Não deve incluir abreviaturas. Deve apresentar-se estruturado.

Originais: Introdução, Objectivos, Metodologia, Resultados e Conclusões.

Revisões: Introdução, Objectivos, Desenvolvimento e Conclusões.

Casos clínicos: Introdução, Caso Clínico e Conclusões.

O resumo será coerente com o conjunto do artigo.

4. Palavras-chave

Devem ser incluídas até seis palavras-chave, na língua original do artigo e em inglês, preferencialmente previstas na lista do Medical Subject Headling List of the Index Medicus.

5. Cabeçalho

Versão reduzida do título, para eventuais efeitos de composição gráfica.

6. Introdução / Objectivos

Exposição, completa e sucinta, do estado actual do conhecimento sobre o tema do artigo. Expressão clara das motivações e objectivos que levaram ao planeamento do trabalho.

7. Metodologia

Descrever os critérios de selecção do material do estudo e o desenho do mesmo. Usar unidades internacionais. Assinalar os métodos estatísticos.

8. Resultados

Devem ser escritos os dados relevantes.

Os dados constantes de tabelas ou figuras não devem, em princípio, ser repetidos no texto. As tabelas devem ser nomeadas em numeração romana (p. ex.: Tabela IV), por ordem de aparecimento no texto. As figuras devem ser nomeadas em numeração árabe (p. ex.: Fig. 4.), pela ordem de aparecimento no texto. A responsabilidade de protecção dos direitos de figuras previamente publicadas é da responsabilidade dos autores. A publicação de fotografias de pessoas exige a completa dissimulação da sua identidade ou uma folha assinada de consentimento informado e parecer de uma Comissão de Ética de uma instituição pública.

9. Discussão

Não voltar a apresentar resultados, evitando redundâncias. Não mencionar dados que não foram apresentados nos resultados. Dar-se-á relevo aos aspectos novos, reflectir sobre as limitações e justificar os erros ou omissões. Relacionar os resultados com outros estudos

relevantes. As conclusões deverão basear-se apenas nos resultados. Poderão fazer-se recomendações.

10. Bibliografia

As referências bibliográficas devem ser identificadas no texto através de numeração árabe, entre parêntesis, ao nível da linha. Devem ser numeradas segundo a ordem de aparecimento no texto. A referência deve incluir o apelido e inicial de todos os autores; se o artigo tiver mais de seis autores, devem ser referidos apenas os três primeiros, seguindo-se a expressão et al. Os nomes dos autores devem ser seguidos por título do artigo, abreviatura da revista segundo as recomendações do List of Journals Indexed in Index Medicus, ano de edição, volume, primeira e última página. As referências a livros devem incluir o título do livro, seguido do local de publicação, editor, ano, e páginas relevantes. Se alguma referência se encontrar pendente de publicação deverá descrever-se como "in press". A referência a comunicações pessoais não é aceitável.

11. Dúvidas ou casos omissos

Serão resolvidos de acordo com as normas do ICMJE (<http://www.icmje.org>).